Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 19, 2, 2016, (286-299)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

Екстрахиране и охарактеризиране на каротеноидни пигменти от растителни източници

Светла Дянкова*, Мария Донева, Айтен Солак, Петя Методиева

Институт по криобиология и хранителни технологии, бул.Черни връх 53, 1407 София, България
**E mail: svetla.diankova@ikht.bg*

Extraction and characterization of carotenoid pigments from plant sources

Svetla Dyankova*, Maria Doneva, Ayten Solak, Petya Metodieva

Institute of Cryobiology and Food Technologies, 53 Cherni Vrah Blvd, 1407 Sofia, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Установените многобройни здравословни проблеми при използването на синтетични оцветители (вкючително, карциногенност и хронична токсичност) доведоха до подновяване на интереса към природните пигментни вещества, получени от различни източници (растения, гъби, микроорганизми и животни).

Целта на изследването е получаване и охарактеризиране на пигментни екстракти богати на каротеноиди от 4 растителни източници – морков, домат, червен пипер и тиква. От всеки вид суровина са изследвани 3 варианта: свежи, лиофилизирани и сушени на конвенционална сушилня. Като екстрагенти са използвани изопропанол, 90% ацетон и хептан. Най-високо съдържание на каротеноиди е получено при сушен червен пипер след екстракция с хептан – 246,65mg/l, последвано от лиофилизирана тиква и морков при екстрагент изопропанол, съответно 74,50 mg/l и 35,20 mg/l. При домат сорт „Белла“, най-висок добив е получен при лиофилизирана суровина и екстрагент 90% ацетон – 21,95 mg/l. Свежите суровини не са подходящи за екстрак-

SUMMARY

The discovery of numerous health problems with the use of synthetic colorants (including carcinogenicity and chronic toxicity) led to renewed interest in natural pigments derived from different sources (plants, fungi, microorganisms and animals).

The aim of the study was to obtain and characterize pigment extracts rich in carotenoids from 4 plant sources – carrot, tomato, red pepper and pumpkin.

Three versions of each type of raw material were tested: fresh, freeze-dried and dried in a conventional dryer. As solvents were used isopropanol, 90% acetone and heptane. The highest content of total carotenoids was obtained from dried red pepper after extraction with heptane – 246,65 mg/l, followed by freeze-dried pumpkin and carrot in isopropanol solvent, 74,50 mg/l and 35,20 mg/l respectively. In tomato variety "Bella", the highest yield was obtained from freeze-dried material and solvent 90% acetone – 21,95 mg/l. The fresh raw materials are not suitable for extraction of

ция на пигменти. Като цяло лиофилизираните проби дават по-висок добив, с изключение на червения пипер, при който най-високи резултати се получават след конвенционално сушене.

Ключови думи: натурални пигменти, каротеноиди, екстракция

pigments. In general, the lyophilized samples give a higher yield, except red pepper, wherein the best results are obtained after conventional drying.

Keywords: natural pigments, carotenoids, extraction

УВОД

Цветът е важен фактор за потребителите при избора на крайния продукт, което е от голямо значение за хранително-вкусовата и фармацевтичната промишленост при производството на бои, козметични продукти, храни за животни и др, (Живкова, 2012; Boo et al., 2011). Натрупаните данни, че много от синтетичните оцветители, причиняват здравословни проблеми, включително токсичност и канцерогенност, доведоха до по-екстензивно използване на природните багрила (Scotter, 2011; Scotter and Castle, 2004). В отговор на тази тенденция и с цел опазване на човешкото здраве все по-често се търсят начини за получаване и прилагане на естествени оцветители при производството на бои, нови здравословни и функционални храни, козметични продукти и д. (Bener et al., 2010; Kumar and Sinha, 2004). Висшите и нисши растения са най-големите източници на природни пигменти които могат да се използват като оцветители за храни.

Растителните пигменти могат да бъдат класифицирани в две големи групи – мастноразтво-

INTRODUCTION

Color is an important factor for consumers when choosing a final product which is of great importance for the food and pharmaceutical industries in the production of paints, cosmetics, animal feed, etc. (Jivkova, 2012; Boo et al., 2011).

The accumulated evidence that many synthetic colorants cause health problems, including toxicity and carcinogenicity led to extensive use of natural dyes (Scotter, 2011, Scotter and Castle. 2004).

In response to this trend and to protect human health people are increasingly looking for ways of obtaining and application of natural dyes in the production of new healthy and functional foods, cosmetics, textile, paint and others (Bener et al 2010; Kumar and Sinha, 2004).

Higher and lower plants are the biggest sources of natural pigments that can be used as food dyes.

Plant pigments can be classified into two broad groups - fat-soluble and water-soluble.

рими и водоразтворими. Сред мастноразтворимите пигменти най-разпространени са хлорофилите и каротиноидите (Socaciu, 2007).

Каротеноидите представляват жълти до оранжево-червени пигменти, повсеместно разпространени в природата – висши растения, мъхове, водорасли, бактерии, гъби. Повечето са въглеводороди с 40 въглеродни атома, съдържащи две крайни пръстенни системи, свързани със спрегнати двойни връзки. Има две групи каротеноиди: каротени, съставени само от въглерод и водород; и ксантофили, които са техни окислени аналози. В последните кислородът може да е част от хидроксилна група (например зеаксантин), от оксигрупи (например в кантаксантин) или комбинация от двете (например в астаксантина) (Arvayo-Enriquez H. et al., 2013).

Полиеновата система придава на каротеноидите характерната им молекулна структура, обуславя химичните им свойства и способността им да поглъщат светлина. Всяка двойна връзка от полиеновата верига може да съществува в две конфигурации: като геометрични изомери (цис- или транс-). Транс-изомерите са термодинамично по-стабилни от цис-изомерите. Повечето природни каротеноиди са транс-изомери (Updike and Schwartz, 2003). Каротеноидите са ефективни антиоксиданти. Независимо от разнообразното им биологично действие, отделни каротеноиди или техни смеси се използват като естествени оцветители за

Among the fat-soluble pigments most common are the chlorophylls and carotenoids (Socaciu, 2007).

Carotenoids are yellow to orange-red pigments ubiquitous in nature – higher plants, mosses, algae, bacteria and fungi. Most are hydrocarbons with 40 carbon atoms containing two end ring systems linked by conjugated double bonds. There are two groups of carotenoids: carotenes, composed only of carbon and hydrogen; and xanthophylls, which are their oxidized analogs. In the last, oxygen may be part of a hydroxyl group (e.g. zeaxanthin) of the keto group (for example, canthaxanthin) or a combination of both (e.g. astaxanthin) (Arvayo-Enriquez et al., 2013).

The polyene system of carotenoids their characteristic molecular structure determines their chemical properties and their ability to absorb light. Each double bond of the polyene chain can exist in two configurations: as geometric isomers (cis or trans). Trans-isomers are thermodynamically more stable than the cis-isomers. Most natural carotenoids are trans-isomers (Updike and Schwartz, 2003). Carotenoids are effective antioxidants.

Regardless of their varied biological action, individual carotenoids or their mixtures are used as natural coloring agents for

зват като натурални оцветители за храни и напитки. Интензивният цвят на оцветителите на база каротеноиди (или на база олеорезини, които ги съдържат), варира от жълт през оранжев до червен в зависимост от това кои представители от тази група преобладават (Solomosi et. al., 2015).

Конвенционалната екстракция на каротеноидите използва тяхната разтворимост в липиди или неполярни разтворители. Ако растителният материал е предварително изсушен се използват несмесващи се с вода течности като петролев и етилов етер. При работа със свеж материал по-подходящи са етанол или ацетон, които изпълняват две функции – екстракция и дехидратация. Разтворителите не трябва да съдържат кислород, киселини или халогенни елементи, за да се избегне деградацията (Limbo et al., 2007). Не съществува оптимален екстрагент за всички каротеноиди: въглеродният дисулфид е най-добър разтворител, но е летлив, токсичен и запалим, което силно ограничава използването му. Етерът също е ефикасен, но не се използва заради летливостта и запалителността си. Други разтворители като хексан, хептан и изооктан са по-слаби екстрагенти за каротеноидите, но са предпочитани заради другите им качества. От друга страна подборът на подходящия екстрагент зависи и от това кои съединения

food and beverages. The intense color of coloring agents based on carotenoids (or based on oleoresin containing them) ranges from yellow through orange to red, depending on which representatives of this group prevail (Solomosi et. al., 2015).

Conventional extraction of carotenoids uses their solubility in lipids or nonpolar solvents. If the plant material is pre-dried, water-immiscible liquids such as petroleum and ethyl ether are used. When working with fresh material, it is better to use with ethanol or acetone that perform two functions – extraction and dehydration.

The solvents should not contain oxygen, acids or halogens, in order to avoid degradation (Limbo et al., 2007).

There is no optimal extractant for all carotenoids: carbon disulfide is the best solvent, but is volatile, toxic and flammable, which severely limits its use. Ether is also effective, but is not used because of its volatility and flammability.

Other solvents such as hexane, heptane and isooctane are weaker extractants of carotenoids but are preferred because of other properties they have. On the other hand the selection of the appropriate extractant depends on which compounds are to be

ще се екстрахират: полярните разтворители (ацетон, метанол, етанол) са добри за ксантофилите, но не и за каротените (Arvayo-Enriquez et al., 2013).

По тази причина се счита, че за пълна екстракция на каротеноидите трябва да се използват проби с ниско влагосъдържание, които се третират със смеси от нискополярни и неполярни разтворители. Освен това извличането трябва да се проведе бързо, при избягване на контакт със светлина, кислород и високи температури.

Целта на изследването е получаване и охарактеризиране на пигментни екстракти богати на каротеноиди от 4 растителни източници – корен морков, плодове – домат, червен пипер и тиква.

extracted: polar solvents (acetone, methanol, ethanol) are good with xanthophylls, but not with carotenes (Arvayo-Enriquez et al., 2013).

Therefore it is considered that for complete extraction of carotenoids should be used low moisture content samples that are treated with mixtures of low polar and non-polar solvents. Moreover, extraction should be carried out quickly, avoiding contact with light, oxygen or high temperatures.

The aim of the study is preparation and characterization of pigment extracts rich in carotenoids from 4 plant sources – carrot root and tomato, red pepper and pumpkin fruits.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Растителен материал: При подбора на растителните суровини са отчетени следните фактори – високо съдържание на каротеноиди, достъпност, да са видове типични за България и съответно предлагани от български земеделски производители и да са с ниска цена. Експериментирано бе със следните суровини: корен морков (*Daucus carota ssp. sativus*), плодове – домат (*Solanum lycopersicum*), червен пипер *(Capsicum annuum)* и тиква (*Cucurbita moschata*). По отношение на сортовия състав – морков „Супер мискет”, домат „Бела”, червен пипер „Гороглед”, тиква „Цигулка”.

MATERIAL AND METHODS

Plant material: The selection of plant materials considered the following factors: high content of carotenoids; accessibility; species typical for Bulgaria and respectively offered by Bulgarian farmers and low cost. We tested the following raw materials: carrot root (*Daucus carota ssp. Sativus*), tomato (*Solanum lycopersicum*), red pepper (*Capsicum annuum*) and pumpkin (*Cucurbita moschata*) fruits.

With regard to the used varieties: "Super Muscat" carrot, "Bella" tomato, "Gorogled" red pepper, "Violina" pumpkin.

Предварителна подготовка на суровината включваше следните етапи: измиване, отстраняване на зелените части и наранените области и нарязване на късове с размери 0,5-1,0 cm. От всеки вид суровина бяха изследвани три вида проби: лиофилизирани, сушени на конвенционална сушилня и свежи. Свежата суровина се подлагаше веднага на екстракция със съответния разтворител. За втория вариант материалът се разпределяше на тънък слой в тави и се сушеше в сушилня с въздушна вентилация при температура 50°C. Времетраенето на сушене варира в зависимост от вида на суровината от 8 до 24 h. При първия вариант сублимационното сушене бе проведено в лиофилизатор тип TG-16.50 (“Hochvacuum”-Германия) на автоматичен режим и продължителност 24 часа.

Екстракция – Като екстрагенти бяха използвани следните органични разтворители: изопропанол, 90% ацетон и хептан. Съотношението между растителния материал и екстрагента беше 1:10 като за всеки вариант бе направена корекция според опитно определеното съдържание на влага.

Остатъчно влагосъдържание– остатъчното влагосъдържание на растителните проби бе определено на електронна везна “Sartorius thermo-control” с инфрачервено нагряване.

Тънкослойна хроматография (TLC) – За качествен анализ и

The preliminary preparation of raw material included the following steps - washing, removal of the green parts and the injured areas and cutting into pieces measuring 0,5-1,0 cm. Three variants of each type of raw material were tested: freeze-dried, dried in a conventional dryer and fresh. Fresh raw material was subjected immediately to extraction with appropriate solvent. For the second variant, the material was distributed as a thin layer into trays and dried in an oven with air ventilation at a temperature 50°C. The duration of drying varies depending on the type of raw material from 8 to 24 h. In the first case freeze-drying is performed in a freeze-drier type TG-16.50 (''Hochvacuum''-Germany) in automatic mode and duration – 24 hours.

Extraction – As extractants were used the following organic solvents: isopropanol, 90% acetone and heptane. The correlation between plant material and solvent was 1:10 and for each variant adjustment was made based on moisture content.

Residual moisture content – The residual moisture content of the plant raw materials was measured with Sartorius Thermo Control balance YTC 01L with infrared heating.

Thin layer chromatography (TLC) – Qualitative analysis and

идентификация на каротеноидите в екстрактите бе използвана тънкослойна хроматография. Пробите се нанасяха на ивица с ширина 1 cm на плаки TLC Silica gel 60 F_{254} (Merck), в количество от 40 до 60 µl. Проявяването бе извършено със смес от петролев етер: бензол в съотношение 1:9 (*v:v*). След проявяване, плаките бяха изсушени на стайна температура и наблюдавани на видима светлина.

Количествено съдържание на каротеноиди – Методът се базира на средните стойности за абсорбционните коефициенти и дължината на вълната, при която каротеноидите имат най-голяма абсорбция – *Method of Mean (*Biehler et al., 2009*).* Проби от екстрактите бяха разредени със съответния разтворител и бе измерена абсорбцията при 450 nm.

За изчисляване на средната концентрация на каротеноиди (mol/l) бе използвана следната формула:

identification of carotenoids in extracts were carried out using thin layer chromatography. The samples were sprayed as 10.0 mm bands on TLC Silica gel 60 F_{254} plates (Merck). Sample volumes ranged between 40 and 60 µl. Development was performed with a mixture of petroleum ether: benzene = 1 : 9 (v : v). After development, the plate was dried at ambient temperature and observed in visible light.

Quantitative determination of carotenoids - The method is based on the average of the absorption coefficients and the wavelength at which the carotenoids have the greatest absorption – *Method of Mean* (Biehler et al., 2009). Samples of the extracts were diluted with the appropriate solvent and the absorbance at 450 nm was measured.

To calculate the average carotenoid concentrations (mol/l), the following equation was used:

$$C\ (mol/l) = \frac{A450 * Fd}{135310} \qquad (1)$$

където, *A*450 е средния абсорбционен максимум и *Fd* е факторът на разреждане. Като се използва средната моларна маса (g/mol), резултатите могат да представят и като грам за литър (g/ l).

where A_{450} is the mean absorbance maximum, and Fd - a dilution factor. Using an average molar mass (g/mol), results can also be expressed as gram per liter (g/l).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В зависимост от предварителното третиране на растителния материал са разработени 3

RESULTS AND DISCUSSION

Three experimental variants were developed depending pretreatment of plant material:

опитни варианта: Вариант 1 (лиофилизирана суровина), Вариант 2 (сушена суровина) и Вариант 3 (свежа суровина). Получените резултати за влагосъдържанието на различните варианти преди подаване за екстракция са дадени в Таблица 1. Както може да се очаква, най-ниско съдържание на влага се наблюдава при лиофилизираната суровина – от 2,25 до 3,10 %.

Variant 1 (freeze-dried material), Variant 2 (dried material) and Variant 3 (fresh material). The results for the moisture content of the various samples, prior to submission for extraction are given in Table 1. As can be expected, lower moisture content is observed in the freeze-dried material - from 2.25 to 3.10 %.

Таблица 1. Влагосъдържание в растителния материал при различните варианти на предварителна обработка (средна стойност ± SD, n=3)
Table 1. Moisture content in plant material at different variants of pretreatment (mean ± SD, n=3)

№	Наименование Name	Влагосъдържание (%) Moisture content (%)		
		Вариант 1 Variant 1	Вариант 2 Variant 2	Вариант 3 Variant 3
1	Червен пипер, плод Red pepper, fruit	3,10±0,20	6,54±0,43	89,99±1,20
3	Домат, плод Tomato, fruit	2,87± 0,15	7,05±0,41	92,05±0,96
4	Морков, корен Carrot, root	2,25±0,21	6,42±0,18	86,95±0,75
5	Тиква, плод Pumpkin, fruit	2,85±0,30	6,90±0,28	90,05±1,03

За всеки от вариантите бе експериментирана екстракция с три вида разтворители – 90% ацетон, изопропанол и хептан. Преди екстракцията варианти 1 и 2 бяха смлени до размер на частиците 2 mm (мелница Fritch), а вариант 3 бе хомогенизиран за 3 min на бързооборотен хомогенизатор. Към всяка от пробите бе добавен част (1/2) от съответния разтворител и те бяха обработени с ултразвук за 30 min. След престой 24 часа при стайна температура, цен-

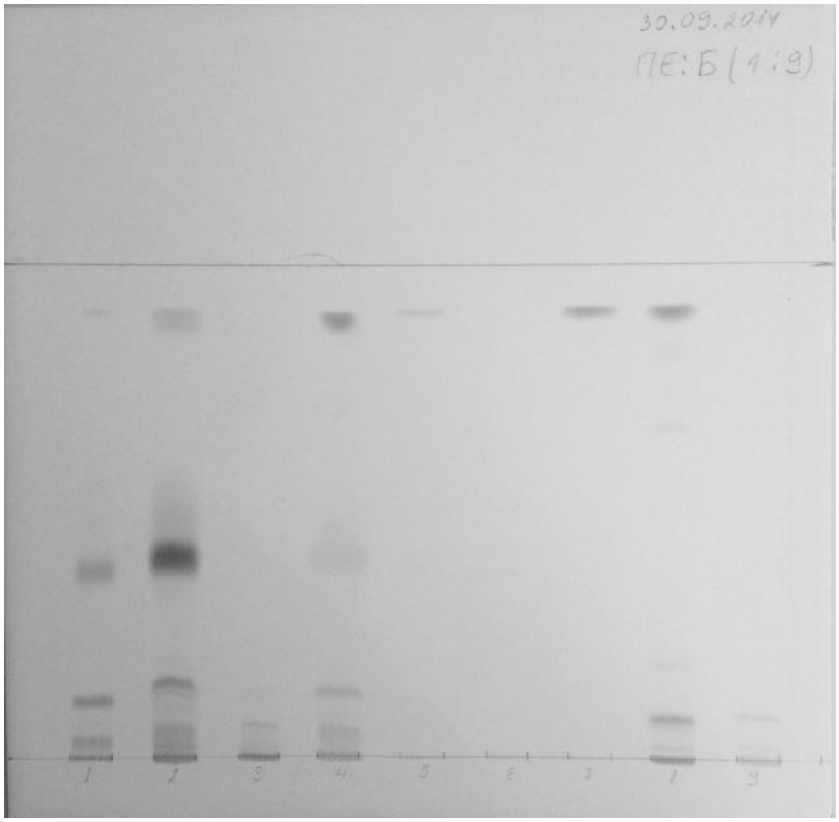
For each of the variants, extraction with three kinds of solvents was conducted – 90% acetone, isopropanol and heptane. Before extraction variants 1 and 2 were ground to a particle size of 2 mm (grinder Fritch), and variant 3 was homogenized for 3 min with high speed homogenizer. To each of the samples was added a portion (1/2) of the corresponding solvent, and then they were treated with ultrasound for 30 min. After 24 hours at room temperature, centrifugation (2000

трофугиране (2000 rpm, 10min) и събиране на супернатантата, екстракцията бе продължена с останалата част от разтворителя при същите параметри. Получените извлеци бяха обединени и съхранявани на тъмно до провеждане на анализите.

Резултатите от тънкослойно-хроматографското изследване на ацетонови екстракти от пипер, домат и морков (различни варианти) са представени на Фигура 1.

rpm, 10min) and collecting of supernatant, the extraction was continued with the remainder of the solvent under the same parameters. The obtained extracts were united and stored in the dark until analysis.

Results from the thin layer chromatographic examination of acetone extracts from pepper, tomato and carrot (variations) are shown in Figure 1.



Фиг. 1. TLC анализ на ацетонови екстракти: 1 – пипер лиофилизиран; 2 – пипер сушен; 3 – пипер свеж; 4 – домат лиофилизиран; 5 – домат сушен; 6 –домат свеж; 7 – морков лиофилизиран; 8 – морков сушен; 9 – морков свеж

Fig. 1. TLC analysis of the acetone extracts: 1 – lyophilized pepper; 2 – dried pepper; 3 – fresh pepper; 4 – lyophilized tomato; 5 – dried tomato; 6 – fresh tomato ; 7 – lyophilized carrot; 8 – dried carrot; 9 – fresh carrot

При почти всички проби се наблюдава интензивна жълта или жълто-оранжева иивица с Rf = 0,92. Тази фракция съответства на β - каротена. При пробата от лиофилизиран морков тази ивица е единствената, която се проявява. Правят впечатление различията в състава на екстрактите в зависимост от предварителната обработка на суровината. При свежите суровини почти не се наблюдава извличане на каротеноидите. Екстрактът от сушен червен пипер има по-богат пигментен състав от лиофилизираната проба, докато при домата от трите варианта най-добри резултати се отчитат при лиофилизата.

Обобщените резултати от количественото определяне на общи каротеноиди във всеки от получените екстракти са представени графично на Фигура 2.

Сравнителният анализ на резултатите от Фигура 2 показа, че от изследваните растителни суровини най-голямо количество каротеноиди в има екстрактите от сушен червен пипер. При тази суровина се отчитат големи различия в добива в зависимост от използвания екстрагент (от 110 до 246 mg/l). Най-високи са стойностите при екстракция с хептан. При екстрактите от домат съдържанието на общи каротеноиди е сравнително ниско. По-добри резултати са получени при лиофилизирана суровина, екстрахирана с 90% ацетон (22 mg/l). Аналогично при вариантиAlmost all samples were observed to have intense yellow or yellow-orange stripe with Rf = 0,92. This fraction corresponds to the β-carotene. In the sample of lyophilized carrot this stripe is the only one that occurs. Differences in the composition of the extracts were noticed, depending on the pre-treatment of the raw material. Almost no extraction of carotenoids was observed among the fresh raw materials. The extract of dried red pepper has a richer pigment composition than the lyophilized sample, while out of the three tomato variants the best results were observed through the extraction of lyophilized material.

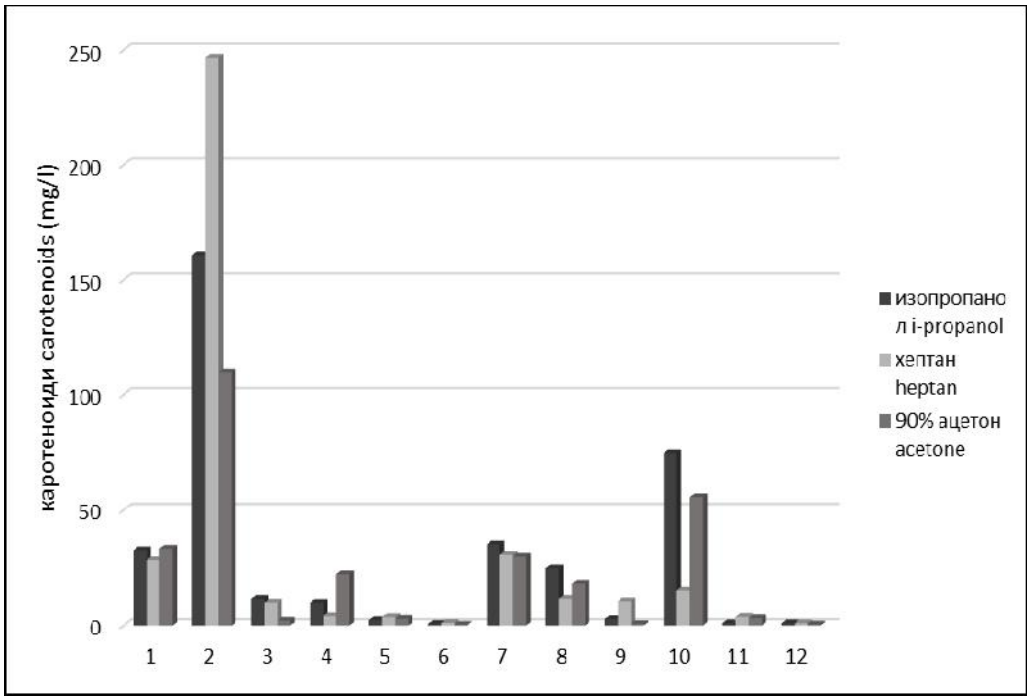
The summarized results of the quantification of total carotenoids in each of the extracts obtained are presented graphically in Figure 2.

The comparative analysis of the results of Fig. 2 shows that out of the studied plant materials the greatest amount of carotenoids was observed in the extracts of dried red pepper. In this material large differences in extraction depending on the used extractant were reported (110 to 246 mg/l). The highest amounts were extracted with heptane. In tomato extracts contents of total carotenoids was relatively low.

Better results were obtained in a lyophilized material, extracted with 90% acetone (22 mg/l). Similarly, for carrot and pumpkin variants,

те морков и тиква, най-високи стойности са отчетени при лиофилизирана суровина. При моркова не се отчитат съществени различия в зависимост от вида на екстрагента (от 30 до 35 mg/l), докато при тиквата пробите екстрахирани с ацетон и изопропанол са със значително по-висок добив (56 до 75 mg/l).

the highest values were reported in lyophilized material. In carrot no significant differences depending on the type of extractant were reported (30 to 35 mg/l), while the pumpkin samples extracted with acetone and isopropanol have a significantly higher yield (56 to 75 mg/l).



Фиг. 2. Обобщени данни за съдържанието на каротеноиди в екстрактите: 1 – пипер лиофилизиран; 2 – пипер сушен; 3 – пипер свеж; 4 – домат лиофилизиран; 5 – домат сушен; 6 – домат свеж; 7 – морков лиофилизиран; 8 – морков сушен; 9 – морков свеж; 10 – тиква лиоф.; 11 – тиква сушена; 12 – тиква свежа

Fig. 2. Summarized data of the content of carotenoids in the extracts: 1 – lyophilized pepper; 2 – dried pepper; 3 – fresh pepper; 4 – lyophilized tomato; 5 – dried tomato; 6 – fresh tomato; 7 – lyophilized carrot; 8 – dried carrot; 9 – fresh carrot; 10 – lyophilized pumpkin.; 11 – dried pumpkin; 12 – fresh pumpkin

ИЗВОДИ

Анализът на експерименталните данни показа, че добивът на

CONCLUSIONS

The yield of the carotenoids pigments depends on several

каротеноидни пигменти зависи от няколко фактора:

1) Вид на растителния материал. От изследваните суровини най-голямо количество екстрактивни вещества се изолират от червения пипер, последвани от плод тиква и корен морков. При червения пипер пигментният състав е най-богат и включва голямо разнообразие на каротеноиди: капсантин, капсорубин, капсантин 5,6-епоксид, β-криптоксантин, зеаксантин, а също и β-каротен. Комбинацията от тези компоненти е причина за наситения червен цвят на екстракта. От друга страна при другите две суровини общото количество на каротеноиди е по-малко, но те са представени почти изцяло като β-каротен.

2) Предварителна обработка на суровината. Свежите суровини не са подходящи за екстракция на каротеноидни пигменти. Като цяло лиофилизираните проби дават по-висок добив, с изключение на червения пипер, при който най-високи резултати се получават след конвенционално сушене. От икономическа гледна точка конвенционалното сушене е подходящ метод на обработка и за морковите и тиквите (задоволителен добив, при много по-ниска цена), но не и за доматите.

3) Използван екстрагент. Каротеноидите са мастно-разтворими съединения и по тази причина за тяхното изолиране са подходящи органични разтворители. От експериментираните екстрагенти хептанът е най-подходящ за екс-

factors:

1) Type of plant material. Of the studied material, the greatest amount of extractive substances were isolated from red pepper, followed by pumpkin and carrot. In red pepper pigment composition is the richest and includes a wide variety of carotenoids: capsanthin, capsorubin, capsanthin-5,6-epoxide, β-cryptoxanthin, zeaxanthin, and β-carotene. The combination of these components is the cause for the deep red color of the extract. On the other hand in the other two materials, the the total amount of carotenoids is less, but they are represented almost entirely as β-carotene.

2) Pretreatment of raw material. The fresh raw materials are not suitable for extraction of the carotenoid pigments. Generally, the lyophilized samples give a higher yield, except for red pepper, wherein the best results were obtained after conventional drying. From an economic point of view, the conventional drying method is suitable for processing carrots and pumpkins (satisfactory yields at a lower price), but not for tomatoes.

3) Extractant used. Carotenoids are fat-soluble compounds and therefore organic solvents are suitable for their isolation.

Of the tested extractants, heptane is most suitable for the extraction

тракция на червен пипер, докато за другите суровини добри резултати се получават при изопропанол.

of red pepper, while for other raw materials good results were obtained with isopropanol.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Живкова В.** Природни оцветители част III, *В: Научни трудове на Русенския университет - 2012, том 51, серия 1.2, Русе, Издателски център към Русенски университет*, стр. 206-211.
2. **Arvayo-Enriquez H., Mondaca-Fernande I., Gortarez-Moroyoqui P., Lopez-Cervantes J., Rodriguez Ramirez R.** Carotenoids extraction and quantification: a review. *Anal. Method*, 2013, vol.5, 12, pp. 2916-2924.
3. **Bener M, Ozyurek M, Guclu K, Apak R.** Polyphenolic contents of natural dyes produced from industrial plants assayed by HPLC and novel spectrophotometric methods. *Industrial Crops and Products,* 2010, vol. 32, 3, 499-506.
4. **Biehler E., Mayer F., Hoffmann L., Krause E., Bohn T.** Comparison of 3 spectrophotometric methods for carotenoid determination in frequently consumed fruits and vegetables. *J Food Sci*, 2010, 75, No. 1, pp. 55-61.
5. **Boo HO, Hwang SJ, Bae CS, Park SH, Song WS.** Antioxidant activity according to each kind of natural plant pigments. *Kor. J. Plant Res.* 2011, vol. 24, 1, 134-141.
6. **Kumar JK, Sinha AK.** Resurgence of natural colourants: a holistic view. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 2004, vol. 18, 1, 59-84.
7. **Limbo S., Torri L., Piergiovanni L.** Light-induced changes in an aqueous β-carotene system stored under halogen and fluorescent lamps, affected by two oxygen partial pressures. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, vol. 55, 13, pp. 5238-5245.
8. **Scotter MJ.** Methods for the determination of European Union-permitted added natural colours in foods:

REFERENCES

1. **Arvayo-Enriquez H., Mondaca-Fernande I., Gortarez-Moroyoqui P., Lopez-Cervantes J., Rodriguez Ramirez R.** Carotenoids extraction and quantification: a review. *Anal. Method*, 2013, vol.5, 12, pp. 2916-2924.
2. **Bener M, Ozyurek M, Guclu K, Apak R.** Polyphenolic contents of natural dyes produced from industrial plants assayed by HPLC and novel spectrophotometric methods. *Industrial Crops and Products,* 2010, vol. 32, 3, 499-506.
3. **Biehler E., Mayer F., Hoffmann L., Krause E., Bohn T.** Comparison of 3 spectrophotometric methods for carotenoid determination in frequently consumed fruits and vegetables. *J Food Sci*, 2010, 75, No. 1, pp. 55-61.
4. **Boo HO, Hwang SJ, Bae CS, Park SH, Song WS.** Antioxidant activity according to each kind of natural plant pigments. *Kor. J. Plant Res.* 2011, vol. 24, 1, 134-141.
5. **Jivkova V.** Natural colorants Part III, *In: Scientific Works of the University of Ruse - 2012, vol. 51, series 1.2, Ruse, Publishing Center at the University of Ruse*, pp. 206-211 (in Bulgarian).
6. **Kumar JK, Sinha AK.** Resurgence of natural colourants: a holistic view. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 2004, vol. 18, 1, 59-84.
7. **Limbo S., Torri L., Piergiovanni L.** Light-induced changes in an aqueous β-carotene system stored under halogen and fluorescent lamps, affected by two oxygen partial pressures. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, vol. 55, 13, pp. 5238-5245.
8. **Scotter MJ, Castle L.** Chemical interactions between additives in foodstuffs: a review. *Food Addit Contam*., 2004, 21(2), 93-124.

a review. *Food Additives and Contaminants,* 2011, 28, 5, 527-596.
9. **Scotter MJ, Castle L.** Chemical interactions between additives in foodstuffs: a review. *Food Addit Contam*., 2004, 21(2), 93-124.
10. **Socaciu C.** Food Colorants: Chemical and Functional Properties. *CRC Press,* 2007, 637 pp.
11. **Solomosi K, Latruffe N, Morant-Marceau A, Schoefs B.** Food colour additives of natural origin. *In: Colour additives for food and beverages. (ed. M. Scotter),* 2015, 3-24, Woodhead Publishing.
12. **Updike A. A. and Schwartz S. J.** Thermal processing of vegetables increases cis isomers of lutein and zeaxanthin. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, vol. 51, 21, pp 6184-6190.
9. **Scotter MJ.** Methods for the determination of European Union-permitted added natural colours in foods: a review. *Food Additives and Contaminants,* 2011, 28, 5, 527-596.
10. **Socaciu C.** Food Colorants: Chemical and Functional Properties. *CRC Press,* 2007, 637 pp.
11. **Solomosi K, Latruffe N, Morant-Marceau A, Schoefs B.** Food colour additives of natural origin. *In: Colour additives for food and beverages. (ed. M. Scotter),* 2015, 3-24, Woodhead Publishing.
12. **Updike A. A. and Schwartz S. J.** Thermal processing of vegetables increases cis isomers of lutein and zeaxanthin. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, vol. 51, 21, pp 6184-6190.