

Održiva mikrovalno-potpomognuta ekstrakcija proteina i bioaktivnih spojeva iz nusproizvoda proizvodnje kave

Jukić, Anita

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:063622>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2022.

Anita Jukić

ODRŽIVA MIKROVALNO-
POTPOMOGNUTA EKSTRAKCIJA
PROTEINA I BIOAKTIVNIH
SPOJEVA IZ NUSPROIZVODA
PROIZVODNJE KAVE

Rad je izrađen u Laboratoriju za održivi razvoj, na Zavodu za opće programe, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak, te uz pomoć Marinele Nutrizio, mag. nutr.

ZAHVALA

Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak na svojoj pomoći, trudu i pruženim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada. Iskreno hvala i asistentici Marineli Nutrizio, mag. nutr. na uloženom radu i trudu prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Hvala izv. prof. dr. sc. Mojci Čakić Semenčić na pruženoj pomoći pri izradi rada.

Zahvaljujem se gđi. Marijani Hudina Domladovec, dipl. ing., iz Francka d.d. na ustupljenim uzorcima srebrne pokožice kave.

Veliko hvala svim mojim prijateljima, onima koji su sa mnom dijelili klupe u prostorijama PBF-a i svima koji su na druge načine obilježili ovo razdoblje mog života. Bilo je divno dijeliti iskustvo studiranja s vama!

Najveće zahvale idu mojoj obitelji, a posebno mojim roditeljima. Hvala vam na bezuvjetnoj podršci, ohrabrivanju i svojoj ljubavi koju ste mi pružili. Sve što jesam i što ću ikada biti dugujem upravo vama!

„Svaki dobar dar, svaki savršen poklon odozgor je, silazi od Oca svjetlila u kome nema promjene ni sjene od mijene.“ (Jakovljeva 1,17)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za opće programe
Laboratorij za održivi razvoj

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

ODRŽIVA MIKROVALNO-POTPOMOGNUTA EKSTRAKCIJA PROTEINA I BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ NUSPROIZVODA PROIZVODNJE KAVE

Anita Jukić, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0058211377

Sažetak: Provedena je mikrovalna ekstrakcija polifenola i proteina iz uzoraka pokožice kave uz deioniziranu vodu kao otapalo. Izmjereni udio ukupnih polifenola je bio od 556,3969 do 677,8111 mg EGK (ekvivalent galne kiseline)/100 g, a koncentracija proteina 0,5213 do 0,7734 mg/L. Optimizirani su uvjeti ekstrakcije i ispitan je utjecaj snage mikrovalova i vremena ekstrakcije na udio ekstrahiranih polifenola i proteina. Podaci su obrađeni u programu STATGRAPHICS pri čemu su statistički značajni podaci s p-vrijednošću $<0,05$. Za ekstrakciju ukupnih polifenola ni jedan od ispitivanih parametara se nije pokazao kao statistički značajan, dok su za koncentraciju ukupnih proteina značajna oba parametra te njihov međuodnos. Optimalni parametri za mikrovalnu ekstrakciju ukupnih polifenola i proteina su snaga 135,74 W i vrijeme 3,0 minuta. Analizom proteina određena je prosječna masa i aminokiselinski sastav proteina gdje je utvrđena najveća masa proteina od 70,2 kDa, a najmanja 15,7 kDa. Protein s masom 15,7 kDa je karakteriziran kao protein koji sadrži Barwinovu domenu.

Ključne riječi: mikrovalna ekstrakcija, srebrna pokožica kave, polifenoli, proteini, STATGRAPHICS

Rad sadrži: 53 stranica, 21 slika, 15 tablica, 38 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Pomoć pri izradi: Marinela Nutrizio, mag. nutr.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Mojca Čakić Semenčić (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak (mentor)
3. prof. dr. sc. Anita Slavica (član)*
4. doc. dr. sc. Filip Šupljika (zamjenski član)

Datum obrane: 25. ožujka 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of General Programmes
Laboratory for sustainable development

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION OF PROTEINS AND BIOACTIVE COMPOUNDS FROM COFFEE BYPRODUCTS

Anita Jukić, univ. bacc. ing. techn., 0058211377

Abstract: Microwave assisted extraction of polyphenols and proteins from coffee silverskin was performed with deionized water as solvent. Mass concentration of polyphenols ranged from 556.3969 to 677,8111 mg GAE/100 g and proteins between 0.5213 and 0.7734 mg/L. Extraction conditions were optimized and the influence of microwave power and extraction time was investigated. Data were analyzed in the STATGRAPHICS program. For the extraction of total polyphenols neither microwave power nor time were proven to be statistically significant (p -value <0.05), while both parameters and their interrelationship were significant for the extraction of total proteins. The optimal parameters for microwave extraction of total polyphenols and proteins are 135.74 W power and extraction time of 3.0 minutes. Protein analysis determined their average mass and amino acid composition. The highest measured protein mass was 70.2 kDa and the lowest 15.7 kDa. Protein with a mass of 15.7 kDa was characterized as a Barwin domain protein.

Keywords: microwave-assisted extraction, coffee silverskin, proteins, polyphenols, STATGRAPHICS

Thesis contains: 53 pages, 21 figures, 15 tables, 38 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Anet, Režek Jambrak, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Marinela, Nutrizio, MSc

Reviewers:

1. Mojca, Čakić Semenčić, PhD, Associate professor (president)
2. Anet, Režek Jambrak, PhD, Full professor (mentor)
3. Anita, Slavica, PhD, Full professor (member)
4. Filip, Šupljika, PhD, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: March 25th, 2022

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. INDUSTRIJA KAVE	2
2.1.1. Proizvodnja kave	3
2.1.2. Srebrna pokožica kave	4
2.1.3. Potencijal iskorištenja srebrne pokožice kave.....	6
2.2. PROTEINI	6
2.2.1. Proteini u srebrnoj pokožici kave.....	8
2.3. POLIFENOLI.....	8
2.3.1. Djelovanje polifenola	10
2.4. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA	10
2.4.1. Mikrovalovi.....	10
2.4.2. Primjena mikrovalova u prehrambenoj industriji	11
2.4.3. Mikrovalna ekstrakcija.....	12
2.5. ODRŽIVI RAZVOJ	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Uzorci srebrne pokožice kave	16
3.1.2. Kemikalije i standardi	16
3.1.3. Aparatura i pribor	17
3.2. METODE	19
3.2.1. Mikrovalna ekstrakcija (MW).....	19
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola.....	20
3.2.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry- u	23
3.2.4. Analiza aminokiselina	26
3.2.6. Natrijev dodecil sulfat – elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (eng. <i>sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis</i> , SDS- PAGE).....	28
3.2.7. Statistička obrada rezultata	30
4. REZULTATI I RASPRAVA	31
4.1. Utjecaj mikrovalne ekstrakcije na udio ukupnih polifenola u uzorcima	32
4.1.1 Statistička obrada rezultata ekstrakcije ukupnih polifenola.....	34
4.2. Utjecaj mikrovalne ekstrakcije na udio ukupnih proteina u uzorcima.....	37
4.3. Rezultati analize aminokiselina.....	43
4.4. Rezultati SEC-HPLC i SDS-PAGE analize	46

5. ZAKLJUČCI.....	49
6. LITERATURA.....	50

1. UVOD

U svim svjetskim industrijama danas postaje sve važnije smanjiti količinu nusproizvoda koji nastaju tijekom proizvodnje. Uz oduvijek važne ekonomske aspekte industrijske proizvodnje, danas sve veću ulogu ima ekološka prihvatljivost i utjecaj na okoliš. Od 1992. u gospodarstvu se primjenjuje termin održivog razvoja. Održivost (eng. *sustainability*) je pojam koji obuhvaća politike i strategije kontinuiranog socijalnog i gospodarskog napretka, bez štete za okoliš i prirodne resurse. Održivi razvoj teži gospodarskoj učinkovitosti, društvenoj odgovornosti i zaštiti okoliša.

Danas sve grane industrijske proizvodnje nastoje slijediti ove smjernice, uključujući i jednu od vodećih prehrambenih industrija – industriju kave. Kava se uzgaja u preko 50 zemalja svijeta i više od 125 milijuna ljudi živi upravo zahvaljujući ovoj industriji (Lewin i sur., 2011). Prema podacima ICO-a (eng. *International Coffee Organization*) u godini 2017./18. proizvedeno je 159,7 milijuna vreća kave. Tako masivna proizvodnja uvijek uključuje i velik utjecaj na okoliš. U proizvodnji kave najjači utjecaj na okoliš ima velika količina nusproizvoda, koji nastaju u cjelokupnom procesu obrade kave. Glavni nusproizvodi industrije kave su ljuska, pulpa, srebrne pokožice kave i talog kave nakon pripreve napitka. Ovi nusproizvodi imaju značajnu nutritivnu vrijednost, pa se istražuju mogući načini njihove primjene. Srebrna pokožica kave sadrži veliku količinu vlakana, proteina, celuloze, polifenolnih spojeva te tanina. Zbog ovakvog sastava srebrne pokožice provode se istraživanja o mogućoj izolaciji ovih komponenti i njihovom daljnjem korištenju u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji te za proizvodnju biogoriva.

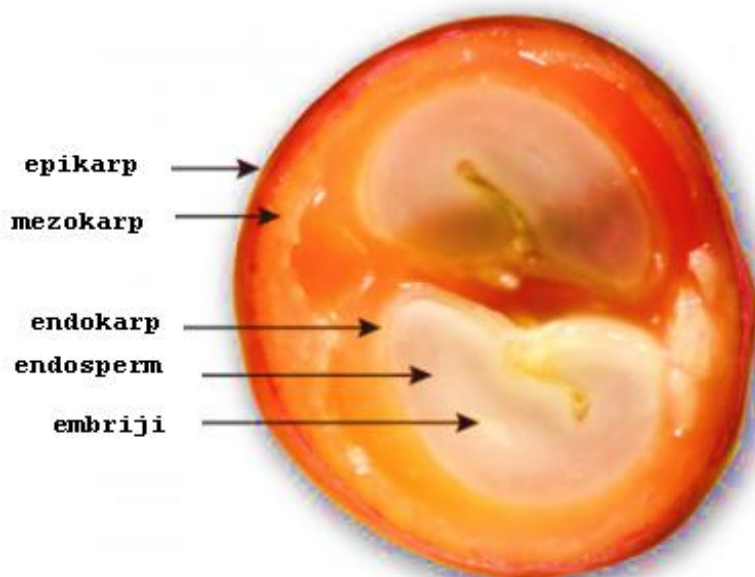
Jedan od učinkovitih, a ekološki prihvatljivih načina izdvajanja komponenti iz srebrne pokožice kave je mikrovalna ekstrakcija (eng. *microwave extraction* – MW). Prednosti mikrovalne ekstrakcije su kraće vrijeme ekstrakcije, brže zagrijavanje, niži temperaturni gradijent te smanjena upotreba otapala. Upravo smanjena upotreba otapala i mogućnost korištenja vode kao otapala čine ovu metodu ekološki prihvatljivijom od klasičnih metoda ekstrakcije komponenti iz biljnih materijala.

U ovom diplomskom radu provedeno je istraživanje čiji je cilj bio izolirati proteine i polifenole iz uzoraka srebrne pokožice kave mikrovalnom ekstrakcijom. Nakon izolacije, spektrofotometrijski su određeni udjeli izoliranih komponenti u uzorku. Provedena je optimizacija procesa u kojoj se ispitivao utjecaj snage (100, 150, 200 W) i vremena (3, 6 i 9 min) MW ekstrakcije na udio izoliranih komponenti. Cilj analize proteina bio je utvrditi njihov sastav i karakteristike.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. INDUSTRIJA KAVE

Kava (lat. *Coffea arabica* L.) je biljka iz porodice broćika (lat. *Rubiaceae*) koja raste u obliku manjeg drveta, ali u divljini može narasti i do visine od 9 do 12 metara. Od sjetve do rasta prvih plodova, biljci kave potrebno je oko 3 godine, ali punu produktivnost postiže 5 do 7 godina nakon sjetve. Plod kave je bobica, u kojoj se nalazi sjeme koje se naziva „zrno kave“. Plod se sastoji od epikarpa (kožica), mezokarpa (pulpa), endokarpa, srebrne pokožice, endosperma i embrija (Krishnan, 2017) (Slika 1.). Rast i diferencijacija pojedinih slojeva i njihova međusobna interakcija tijekom rasta ploda te nakon žetve određuju bogatstvo arome i kvalitetu kave.



Slika 1. Poprečni presjek ploda kave (Farah, 2019)

Kava se uglavnom uzgaja u tropskim područjima, a na rast biljaka i razvoj plodova najviše utječu temperatura, vlaga, Sunčeva svjetlost, vjetrovi i vrsta tla. Dvije ekonomski najznačajnije vrste kave su *C. arabica* L. (Arabika) i *C. canephora* A. (Robusta). Kava arabika se uzgaja na temperaturama od 18 do 22 °C, s tim da može podnijeti i ekstremnije temperature u rasponu od 15 do 30 °C. Robusta kava se uzgaja na nešto višim optimalnim temperaturama od 22 do 28 °C. Optimalna vlažnost zraka za uzgoj robusta kave je 70 do 75 %, a za arabika kavu oko 60 % (Descroix i Snoeck, 2008). Vrijeme dozrijevanje ploda se razlikuje kod različitih vrsta, za kavu arabiku to je oko 300 dana, a za *C. canephora* nešto duže, oko 360 dana. Tijekom dozrijevanja, plod prolazi kroz 5 faza rasta. U prvoj fazi rast se zasniva na ubrzanom dijeljenju stanica, u drugoj fazi dolazi do rasta volumena stanica pa plod postaje sve veći. U trećoj fazi rasta plod

naraste do konačne veličine, ali ima mali udio suhe tvari. Četvrtu fazu karakterizira rast endosperma i formiranje srebrne pokožice kave. U petoj fazi dolazi do povećanja udjela suhe tvari, plod mekša i mijenja boju iz zelene u crvenu, žutu, a ponekad i rozu ili narančastu, ovisno o vrsti kave (Farah, 2019).

Procjenjuje se da oko 125 milijuna ljudi diljem svijeta živi od industrije kave, koja se uzgaja u oko 50 zemalja diljem svijeta (Lewin i sur., 2011). Kao i većina drugih rastućih industrija, industrija kave imala je značajnije uspone i padove od 19. stoljeća. Najveći svjetski proizvođači kave su Brazil, Vijetnam, Kolumbija, Indonezija i Etiopija. Brazil proizvodi oko 30 % svjetske kave, a Vijetnam oko 19,2 %. Veliki prostor za rast i širenje ove industrije daje činjenica da se većina svjetske kave konzumira u ekonomski vodećim državama svijeta. Najveći uvoznici kave su Sjedinjene Američke Države, Njemačka, Italija, Japan i Francuska (ICO, 2016).

2.1.1. Proizvodnja kave

2.1.1.1. Izdvajanje zrna kave suhim i mokrim postupcima

Za proizvodnju kave visoke kvalitete važno je da se prerađuju samo zrele bobice, koje sadrže optimalnu količinu šećera i prekursora arome. Za izdvajanje zrna kave, odnosno uklanjanje pulpe i ovojnice sa ploda, može se koristiti suhi ili mokri postupak. Suhi postupak se uglavnom koristi za prerađivanje robusta kave, ali se u Brazilu koristi i za većinu arabika kave. Suhi postupak je jednostavniji i manje zahtjevan po pitanju sortiranja plodova nakon žetve, jer se svi plodovi nakon žetve ionako suše. Berba se uglavnom provodi na način da se zajedno ubiru nedovoljno zreli, zreli i presušeni plodovi. Na ovakav način se ne može dobiti vrhunska kvaliteta kave i kava se često opisuje kao tvrda ili teška. Sušenje plodova se može provesti prirodno ili umjetno. Prirodno sušenje provodi se na Suncu, tako da se plodovi rasporede u što tanjem sloju na velikom otvorenom prostoru. Ovakav način sušenja ne iziskuje velike troškove za opremu ili energiju, potrebna je samo velika površina. Brzina sušenja ovisi o vanjskim uvjetima, ali za potpuno sušenje plodova uglavnom je potrebno oko 3 do 4 tjedna. Sadržaj vlage u bobicama nakon sušenja trebao bi iznositi oko 12 %, što ih čini relativno sigurnim za skladištenje i daljnju obradu. Umjetno sušenje provodi se u sušnicama koje mogu biti različitih izvedbi. Kod ovakvog sušenja duljina sušenja ovisi o temperaturi. Plodove kave optimalno je sušiti na temperaturi oko 60 °C, a maksimalna temperatura ne bi trebala prelaziti 80 °C, jer na toj temperaturi dolazi do značajnog pogoršanja okusa i arome kave (Vincent, 1987).

Mokri postupak se koristi za arabika kavu te se njime dobiva takozvana blaga kava (eng. *mild coffee*) gdje je fermentacija uključena u proces. Mokri postupak je nešto kompliciraniji i

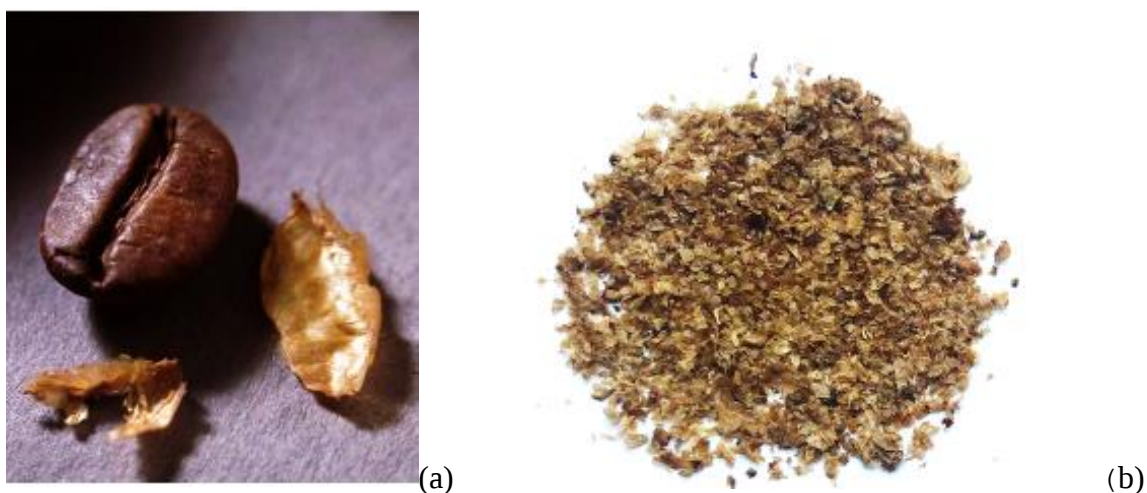
potrebna je veća kontrola procesa, jer nezreli ili djelomično osušeni plodovi mogu uzrokovati probleme sa strojevima. Također, ovakav proces zahtjeva više opreme i utroška energije. Postoje tri različita načina provedbe mokrog postupka. U prvom načinu se pulpa uklanja s plodova u posebnom uređaju. Mukozni sloj zaostaje na zrnu kave i suši se na njemu te omogućuje ulazak šećera u zrno kave, čime se dobiva jako slatka kava. U preostala dva načina sa zrna kave se uklanja i pulpa i mukozni sloj. Razlika je u tome što se u „polu – opranom“ (eng. *semi-washed*) načinu koriste mehanički načini uklanjanja pulpe, a u „potpuno opranom“ (eng. *fully washed*) se koriste mikroorganizmi koji su prirodno prisutni na zrnu kave. Time dolazi do fermentacije i nastajanja tvari arome, a smanjuje se udio šećera (Skin i sur., 2020).

2.1.1.2. Prženje kave

Nakon izdvajanja zrna kave iz plodova slijedi prženje kave. Prije prženja često se provodi sortiranje zrna kave po veličini i uklanjanje nečistoća uz pomoć sustava sita. Cilj prženja kave je stvaranje tvari arome i boje, kako bi se iz prženih zrna pripremio što ukusniji i kvalitetniji napitak kave. Tijekom prženja kave ogrjevni mediji za prženje dosežu temperaturu od 400 do 700 °C, a sama zrna kave oko 250 °C. Temperatura i duljina trajanja prženja ovise o vrsti ogrjevnog medija i izvedbi pržionika. Režim prženja kave ovisi o količini vlage u zrnu, o veličini i obliku zrna, o starosti zrna i vrsti kave. Također, prženje ovisi i o vrsti napitka za koji se kava proizvodi. Prženje kave se provodi jednim od 3 osnovna načina. Svijetlim prženjem se gubi 12 – 15 % mase zrna i dobiva se filter kava. Srednjim prženjem se dobiva takozvana turska kava, a njime se gubi oko 17 % mase. Tamnim prženjem se gubi najviše mase, oko 18 % i njime se dobiva kava za espresso (Šimunac, 2004). Tijekom prženja kave sa zrna se uklanja srebrna pokožica kave, koja je jedina ovojnica zaostala nakon procesa prethodne obrade. Nakon prženja kave, pržionik se prazni i kava odlazi u tank za hlađenje. U tanku za hlađenje zrna kave se miješaju i hlade uz odvođenje toplog zraka i dovođenje hladnog. Nakon toga, zrna kave se prebacuju u silose pržene kave, odakle se dalje po potrebi melju i pakiraju u ambalažu.

2.1.2. Srebrna pokožica kave

Srebrna pokožica kave je vanjska ljuštura zrna kave te predstavlja jedan od najvećih nusprodukata u procesu prženja kave (Ballesteros i sur., 2014) (Slika 2). Danas se ovaj nusproizvod uglavnom odlaže i uklanja spaljivanjem ili sličnim metodama te time predstavlja ekološki i ekonomski problem u uspostavljanju samoodržive proizvodnje kave.



Slika 2. Srebrna pokožica kave odvojena od prženog zrna (a) i usitnjena pokožica kave (b)
(Wen, 2019)

Srebrna pokožica čini oko 4,2 % volumnog udjela ukupnog zrna kave, a budući da je jedini čvrsti ostatak prilikom prženja kave, lako je dostupan u velikim količinama u pržionicama i tvornicama prerade kave. Srebrna pokožica sadrži oko 55 do 70 % vlakana, od čega je 15 % topljivih i 85 % netopljivih vlakana (Narita i Inouye, 2014) (Tablica 1). Udio proteina u pokožici je 14 – 19 %, što je više od udjela proteina u ljuski ili pulpi zrna kave. Antioksidacijska aktivnost srebrne pokožice je značajna zbog prisutnosti polifenolnih komponenti te različitih spojeva koji nastaju Maillardovim reakcijama prilikom procesa prženja (Janissen i Huynh, 2018). Od ugljikohidrata u srebrnoj pokožici kave najprisutniji su glukoza, ksiloza, galaktoza, manoza i arabinoza (Rodrigues i sur., 2015). Od mineralnih tvari najviše su zastupljeni kaliji, kalciji i magneziji (Bessada i sur., 2018).

Tablica 1. Sastav srebrne pokožice kave (Janissen i Huynh, 2018; Narita i Inouye, 2014)

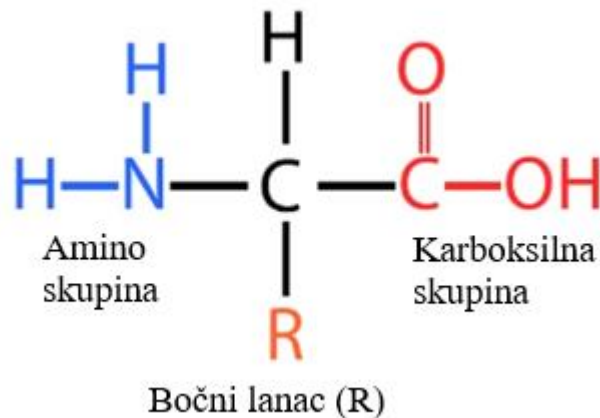
Naziv komponente	Količina (%)
Ukupna vlakna	55 – 70
Proteini	14 – 19
Lipidi	2,2 – 3,6
Ugljikohidrati	44 – 62,1
Celuloza	17,9
Hemiceluloza	13,1
Kofein	0,03 – 1,4
Tanini	0,02

2.1.3. Potencijal iskorištenja srebrne pokožice kave

Zainteresiranost za iskorištenjem srebrne pokožice kave tijekom posljednjih godina naglo je porasla zbog njezinog funkcionalnog i nutritivnog značaja, visokog udjela proteina i vlakana te niskog udjela masti i reducirajućih ugljikohidrata (Narita i Inouye, 2014). Ovakav sastav pokožice omogućuje potencijalnu ekstrakciju ovih visokovrijednih sastojaka i njihovo iskorištavanje kao dodataka u funkcionalnoj prehrani (Ballesteros i sur., 2014). Zbog svog bogatog sastava usitnjena pokožica kave mogla bi se koristiti kao dodatak za kruh, kekse i pahuljice za doručak. Pourfarzad i sur. (2013) su koristili prah srebrne pokožice kave za pripremu kruha u cilju produženja trajnosti i senzorskih svojstava te smanjenju kaloričnosti, a povećanju udjela vlakana. Kozmetička industrija također pokazuje interes za iskorištavanje srebrne pokožice kave zbog visoke antioksidacijske aktivnosti, bogatstva fenolima i melanoidinima te udjela kofeina. Pokožica kave se danas već primjenjuje kao gnojivo i supstrat za proizvodnju biogoriva (Bessada i sur., 2018).

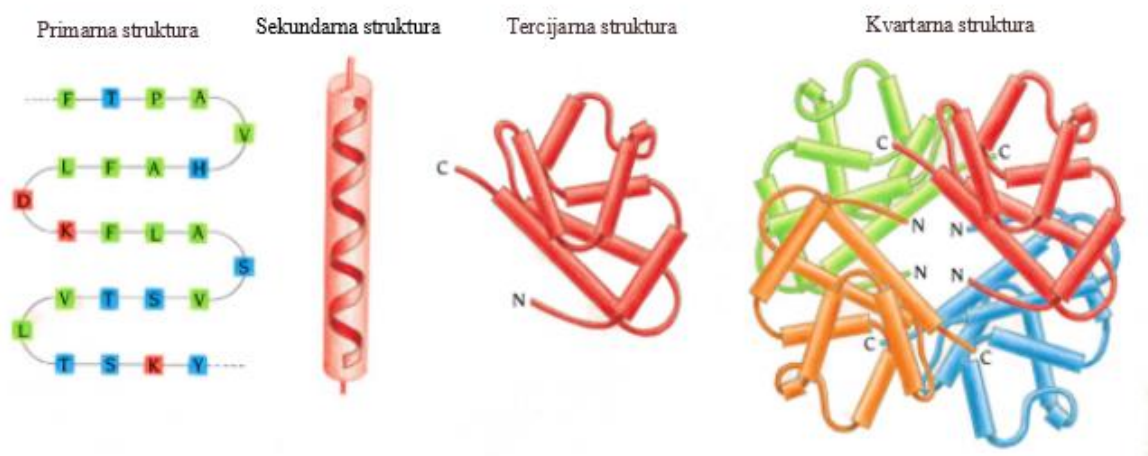
2.2 PROTEINI

Proteini su polimerne molekule koje nastaju povezivanjem aminokiselina peptidnom vezom u duge lance koji sadrže od 100 do 1000 aminokiselinskih ostataka. Proteini su sastavni dio svake stanice, nalaze se i u krvi čovjeka i životinja, gdje imaju funkciju transporta. Aminokiseline koje izgrađuju proteine su sačinjene od centralnog ugljikovog atoma na koji su vezane amino skupina, karboksilna skupina, vodikov atom i bočna skupina (ostatak-R) (Slika 3). Proteine najčešće izgrađuje dvadeset različitih aminokiselina, iako postoje i druge aminokiseline koje izgrađuju specijalne proteine. Aminokiseline se razlikuju po bočnim ostacima i grupiraju se prema funkciji koju pobočni ostaci (R) imaju prilikom izgradnje prostorne strukture proteina. Dije se u četiri skupine: aminokiseline koje kao pobočni lanac imaju čisti ugljik (glicin, alanin, valin, leucin, izoleucin, prolin i fenilalanin); aminokiseline s grupama u pobočnom lancu koje djeluju polarno, ali ne ioniziraju (tirozin, triptofan, serin, treonin, cistein i metionin); kisele aminokiseline (glutaminska i asparaginska kiselina) i bazične aminokiseline (arginin, lizin i histidin).



Slika 3. Osnovna strukturna formula aminokiselina (Elsila i sur., 20007)

Građa proteina određena je s četiri različite strukture (Slika 4). Primarna struktura označava redoslijed odnosno sekvenciju aminokiselina u lancu. Međutim, budući da su proteini jako velike makromolekule, njihova građa ne može se odrediti samo slijedom aminokiselina već se mora uzeti u obzir i prostorni raspored molekule. Raspored lanaca u prostoru naziva se konformacija proteina. Konformacija proteina se opisuje sekundarnom i tercijarnom strukturom. Sekundarna struktura podrazumijeva prostorni raspored samo glavnih atoma peptidnog lanca, ne uzimajući u obzir bočne ogranke. Dva glavna oblika sekundarne strukture su α – uzvojnica i β – nabrana ploča. Tercijarna struktura podrazumijeva trodimenzionalni prostorni raspored svih atoma polipeptidnog lanca. Kvarternu strukturu čini spajanje više peptidnih lanaca u definiranu molekulu.



Slika 4. Prikaz četiri različite strukture građe proteina (Branden i Tooze, 1999)

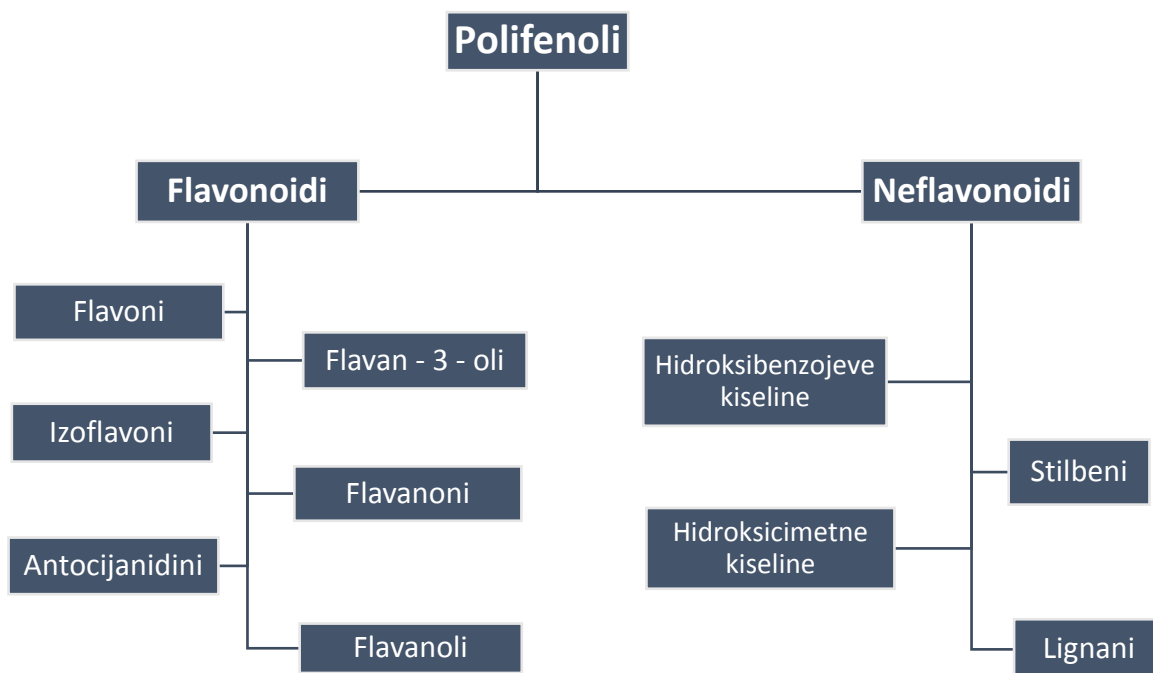
Prostorna građa odnosno konformacija proteina ne može se odrediti kemijskom analizom, već fizikalnim i fizikalno – kemijskim metodama. Djelovanjem nekih vanjski utjecaja, poput temperature, promjene pH vrijednosti otopine, mehaničkih utjecaja i sl., može doći do narušavanja strukture proteina. Ta pojava naziva se denaturacija proteina pri čemu proteini gube svoja biološka svojstva (Karlson, 1993).

2.2.1. Proteini u srebrnoj pokožici kave

S obzirom da je udjel proteina u srebrnoj pokožici kave oko 16 - 19 %, ona se može smatrati dobrim izvorom proteina. Sadržaj ostalih komponenti, koje je moguće izolirati iz srebrne pokožice kave, poput fenola i vlakana, je nešto bolje istražen od proteina. Proteini se iz srebrne pokožice kave ekstrahiraju i određuju jer predstavljaju veliki potencijal u proizvodnji funkcionalne hrane zbog svojih bioloških funkcija. Danas se razvija metoda ekstrakcije proteina iz srebrne pokožice kave uz pomoć proteaza, gdje bi se istovremeno odvijala ekstrakcija i hidroliza proteina, uz eventualnu mogućnost paralelne ekstrakcije i polifenolnih komponenti. Peptidi koji se ekstrahiraju uz pomoć proteaza se proučavaju zbog antioksidacijskog i hipokolesterolemijskog učinka. Prandi i sur., (2021) kao moguću ciljanu primjenu proteina i polifenola ekstrahiranih iz srebrne pokožice kave navode primjenu kao antioksidacijske komponente kod pakiranja hrane, “anti – age“ primjene u kozmetičkoj industriji te korištenje kao dodataka prehrani zbog svojih antioksidacijskih i antimikrobnih svojstava.

2.3. POLIFENOLI

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti prisutni u većini biljaka. Polifenoli su jedni od najraširenijih prirodnih spojeva u biljnom svijetu i ima ih preko 8000 različitih. Djeluju kao jaki antioksidansi i mogu doprinijeti prevenciji kroničnih nezaraznih i autoimunih bolesti. Molekule polifenola su građene od najmanje jednog aromatskog prstena s jednom ili više hidroksilnih skupina. Osim hidroksilnih, na polifenole mogu biti vezane i sulfatne ili acetilne skupine. Polifenoli su uglavnom vezani na druge molekule poput ugljikohidrata. Dijelev se na flavonoidne i ne flavonoidne spojeve (Slika 5).



Slika 5. Podjela polifenolnih spojeva (Hardman, 2014)

Flavonoidi su spojevi koji sadrže petnaest ugljikovih atoma unutar dva aromatska prstena povezana s piranskim prstenom. Flavonoidni spojevi se razlikuju po broju i položaju hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije centralnog aromatskog prstena, a tu spadaju flavoni, flavan 3 oli, izoflavoni, antocijanidini, flavanoni i flavanoli. Flavonoidi čine više od polovice prirodnih fenolnih spojeva. Najbrojnija i najkompleksnija skupina flavonoidnih spojeva su flavon 3 oli, koji mogu biti građeni kao monomeri, dimeri, pa sve do oligomera i polimernih kondenzata. Neflavonoidi su spojevi jednostavnije kemijske građe i njihova struktura se sastoji samo od jednog aromatskog prstena. U neflavonoidne spojeve spadaju fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline i njihovi derivati), stilbeni i lignani (Hardman, 2014). Fenolni spojevi nastaju biosintetskim putevima šikiminske kiseline, fenilpropanoida i flavonoida. Polifenoli u prirodi su uglavnom konjugati mono- i polisaharida, vezanih na jednu ili više fenolnih skupina, a mogu biti i funkcionalni derivati poput estera i metil-estera. Kemijska, fizikalna i biološka svojstva polifenola su određena njihovom glikolizacijom.

2.3.1. Djelovanje polifenola

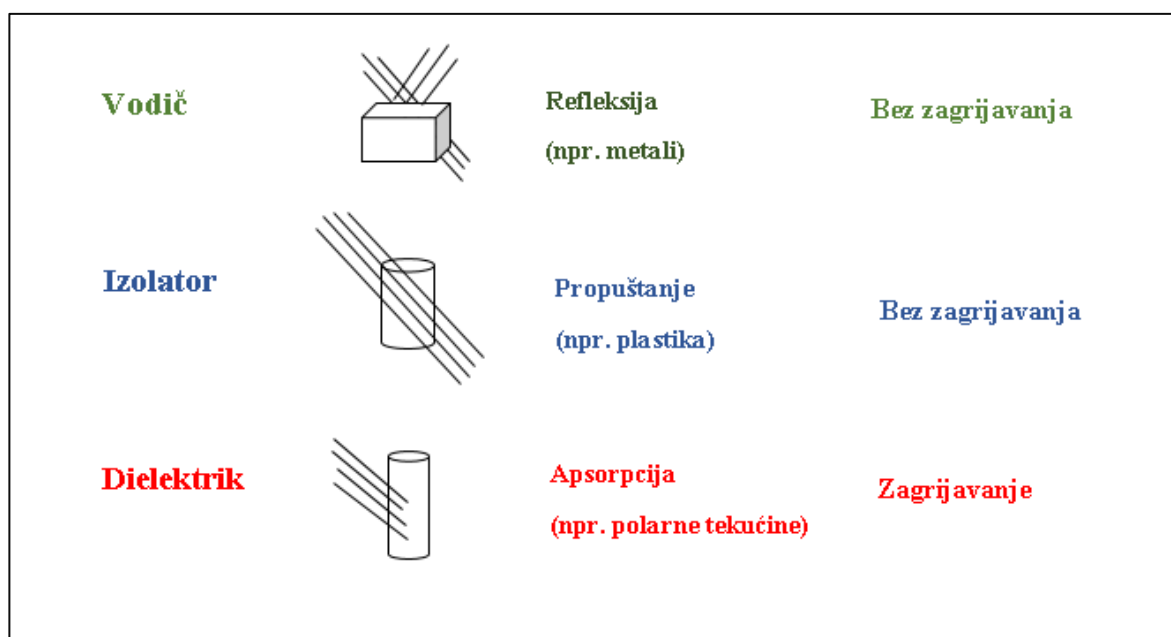
Polifenoli su već od ranije poznati kao spojevi koji imaju cijeli niz pozitivnih učinaka na metabolizam i zdravlje čovjeka. Imaju antioksidacijsko, antimikrobno, antikancerogeno, antibakterijsko, hipoglikemičko i protuupalno djelovanje. Dovoljan unos polifenola u organizam povezuje se sa smanjenjem rizika od kardiovaskularnih bolesti, neurodegenerativnih bolesti, nekih vrsta raka, dijabetesa i osteoporoze. Polifenoli su najviše istraživani zbog svog antioksidacijskog učinka. Oksidacijski stres nastaje kada dođe do pomaka ravnoteže oksido – redukcijских reakcija u stanici i to u smjeru oksidacije. Tada dolazi do porasta broja slobodnih radikala. Polifenoli djeluju kao izvrsni antioksidansi zbog svoje fenolne skupine, koja može primiti elektron i pri tome nastaje fenoksil-radikal koji je relativno stabilan radikal. Tako se zaustavlja daljnja lančana redoks reakcija u stanicama. Pokazalo se kako polifenoli pokazuju pozitivno djelovanje kod kardiovaskularnih oboljenja, gdje ograničavaju aterosklerotička oštećenja tkiva. Smatra se da ateroskleroza nastaje zbog povećanja koncentracije i oksidacije LDL-a (eng. *low-density lipoprotein*) u krvi, a polifenoli inhibiraju oksidaciju LDL-a. Razlog pozitivnog utjecaja polifenola na dijabetes je njihov hipoglikemijski učinak. Polifenoli različitim mehanizmima mogu djelovati hipoglikemično, a jedan od načina je inhibicija unosa glukoze u crijevima ili inhibicija unosa u perifernim tkivima (Scalbert i sur., 2005).

2.4 MIKROVALNA EKSTRAKCIJA

2.4.1. Mikrovalovi

Mikrovalovi su neionizirajući elektromagnetski valovi frekvencije između 300 MHz i 300 GHz. U elektromagnetskom spektru zračenja mikrovalovi su smješteni između X-zraka i infracrvenog zračenja. Mikrovalovi se najčešće primjenjuju zbog svog djelovanja na određene materijale pri čemu se njihova elektromagnetska energija pretvara u toplinsku unutar samog materijala. Mikrovalovi se sastoje od dva okomita oscilirajuća polja - električnog i magnetskog. Zagrijavanje u materijalu uzrokuje električno polje. Konvencionalne metode zagrijavanja se temelje na fenomenu kondukcije i konvekcije i imaju velike gubitke topline, dok se mikrovalno zagrijavanje odvija selektivno i ciljano, tako da su gubici topline minimalni (Mandal i sur., 2007). Mikrovalovi mogu uzrokovati direktno zagrijavanje otapala ili čvrstih komponenti uzorka zbog njihove sposobnosti prodiranja unutar samog materijala i interakcije sa polarnim komponentama uzorka (Azmir i sur., 2013). Zagrijavajuće djelovanje mikrovalova ovisi o dielektričnim svojstvima otapala i uzorka, a ovise o temperaturi i frekvenciji mikrovalova te sastavu otapala i uzorka. Različiti kemijski spojevi apsorbiraju mikrovalnu energiju približno

u omjeru njihovih dielektričnih konstanti. Što je veća vrijednost dielektrične konstante uzorka, veća je apsorpcija mikrovalne energije. Zagrijavanje otapala i uzorka uz pomoć mikrovalova temelji se na ionskoj vodljivosti i dipolnoj rotaciji molekula. Ionska vodljivost je elektroforetsko kretanje iona pod utjecajem elektromagnetskog polja. Otopina iskazuje otpor takvom kretanju iona, čime se u otopini stvara trenje koje pospješuje zagrijavanje otopine. Primjenom elektromagnetskog polja dolazi i do usmjeravanja dipola, što također potiče zagrijavanje otopine tj. uzorka (Pavlović i sur., 2013). Različiti spojevi različito reagiraju na djelovanje mikrovalova, nepolarne komponente reflektiraju mikrovalno zračenje, dok ih polarni spojevi apsorbiraju (Slika 6).



Slika 6. Djelovanje mikrovalova na različite vrste materijala (Gavranić, 2015)

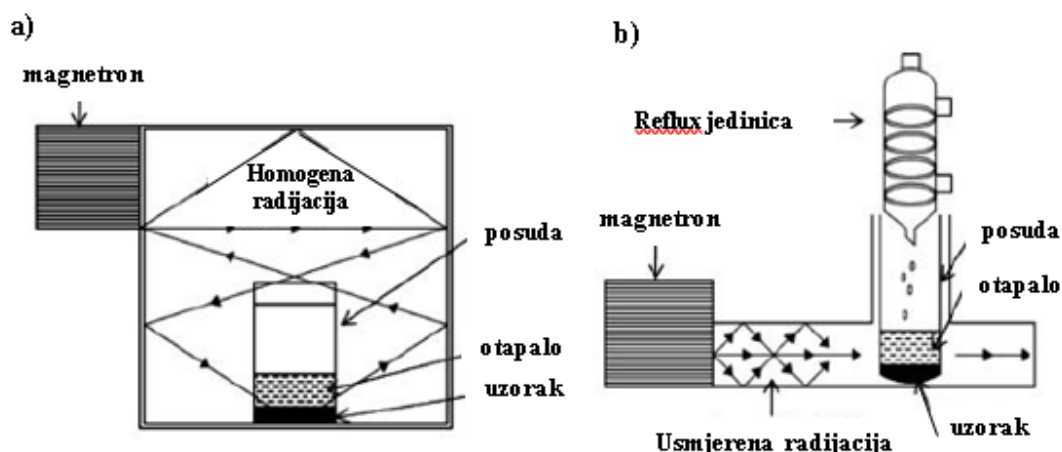
2.4.2. Primjena mikrovalova u prehrambenoj industriji

Mikrovalovi danas imaju široku primjenu u velikom broju industrija: u industriji tekstila, keramike, gume, u prehrambenoj i kemijskoj industriji te medicini. U prehrambenoj industriji mikrovalovi se primjenjuju za temperiranje, odmrzavanje, vakuumsko sušenje, dehidriranje, kuhanje i blanširanje, pasterizaciju, sterilizaciju, ekstrakciju i dr. Najveći problem kod primjene mikrovalova u prehrambenoj industriji predstavljaju veliki troškovi opreme te gubitak energije prilikom prelaska u veće mjerilo (eng. *scale – up*). Stoga je korištenje mikrovalova u industrijskom mjerilu uglavnom opravdano samo u slučaju kada je razvijen proizvod ili način proizvodnje koji ima određene posebne značajke (Orsat i sur., 2017). Primjena mikrovalova u pasterizaciji i sterilizaciji omogućuje uspješnu inaktivaciju patogenih mikroorganizama uz značajno smanjenje trajanja procesa i bez gubitka kvalitete proizvoda. Korištenje mikrovalova

za kuhanje, blanširanje i pečenje doprinosi očuvanju nutritivne vrijednosti hrane. Kuhanje mikrovalovima uglavnom ne inducira Maillardove reakcije u hrani zbog kratkog vremena kuhanja i relativno niskih temperatura. Problem kod kuhanja i pečenja mikrovalovima može biti debljina i nepravilan oblik hrane, koja u takvim slučajevima može biti nejednako toplinski obrađena. Dehidriranje proizvoda mikrovalovima zahtjeva manje energije od konvencionalnih metoda. Danas se razvijaju metode koje kombiniraju konvencionalne metode i upotrebu mikrovalova kako bi se razvili procesi jednolikog zagrijavanja sa što manjim utroškom energije i vremena (Puligundla, 2013).

2.4.3. Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalna ekstrakcija (engl. *microwave assisted extraction*, MW) je neinvazivna, relativno nova, metoda ekstrakcije bioaktivnih komponenti, uglavnom iz biljnih materijala (Kaderides i sur., 2019). Mikrovalna ekstrakcija uvelike ovisi o dielektričnim svojstvima otapala i uzorka, topljivosti uzorka u otapalu i temperaturi postupka. Za mikrovalnu ekstrakciju uglavnom se koriste voda i polarna otapala koja imaju višu dielektričnu konstantu (Vinatoru i sur., 2017). Osim dielektrične konstante, važan faktor prilikom odabira otapala je i faktor raspršenja, koji pokazuje učinkovitost pretvorbe elektromagnetske energije u toplinu (Ajila i sur., 2011). Voda ima veću dielektričnu konstantu od polarnih otapala poput etanola i metanola, ali ima niži faktor raspršenja. Zbog toga se za mikrovalnu ekstrakciju može koristiti smjesa nekog organskog otapala i vode, kako bi se dobilo otapalo više dielektrične konstante i značajnijeg faktora raspršenja. Osim otapala, važan parametar za mikrovalnu ekstrakciju je i temperatura. Viša temperatura ekstrakcije općenito pospješuje učinak ekstrakcije, međutim previsoka temperatura može negativno utjecati na termolabilne komponente u uzorku. Mikrovalna ekstrakcija može biti provedena u zatvorenom ili otvorenom sustavu (Slika 7). U zatvorenim sustavima ekstrakcija se odvija u zatvorenoj posudi sa jednoličnim mikrovalnim zagrijavanjem pri čemu je poželjno da je sustav izveden tako da postoji mogućnost kontrole tlaka i temperature. Ovakav sustav može postići više temperature, a time i efikasniju ekstrakciju zahvaljujući stvaranju povećanog tlaka u posudi, čime dolazi do povećanja točke isparavanja otapala (Vinatoru i sur., 2017; Mandal i sur., 2007). Međutim, u takvim sustavima je uglavnom ograničena mogućnost tretiranja većeg broja uzoraka istovremeno. Otvoreni sustavi za mikrovalnu ekstrakciju mogu biti pogodniji za termolabilne spojeve, kakvi su posebno bioaktivne komponente iz biljnih materijala (Mandal i sur., 2007).



Slika 7. Zatvoreni mikrovalni sustav (a) i otvoreni mikrovalni sustav (b) (Mandal i sur., 2007)

Različiti parametri utječu na mikrovalnu ekstrakciju, poput jačine mikrovalova, njihove frekvencije, vremena izlaganja mikrovalovima, zatim udjela vlage, veličine čestica i sastava uzorka, vrste otapala, temperatura, tlak i sl. (Chan i sur., 2011; Mandal i sur., 2007). Svi ovi parametri utječu na uspješnost ekstrakcije mikrovalovima.

Glavne prednosti mikrovalne ekstrakcije su smanjenje vremena ekstrakcije i smanjenje upotrebe otapala za ekstrakciju. Zbog smanjene količine potrebnog otapala za ekstrakciju mikrovalovima, ova metoda ekstrakcije se smatra „zelenom“ metodom. Korištenje mikrovalova za ekstrakciju određenih komponenti iz biljnog materijala može biti jako pogodno jer se ekstrakcija može provoditi pri nižim temperaturama. To je posebno značajno za sve termolabilne spojeve, kakvi su proteini. Prednosti mikrovalne ekstrakcije su također i brže zagrijavanje, niži gradijent temperature i veći prinosi ekstrakcije.

2.5. ODRŽIVI RAZVOJ

Održivi razvoj ili uravnoteženi razvoj je izraz koji označava gospodarske aktivnosti koje u potpunosti uzimaju u obzir utjecaj na okoliš i maksimalno teže korištenju obnovljivih resursa. Termin je uveden u praksu 1992. na UN-ovoj (eng. *United Nations*) „Konferenciji o okolišu i razvoju“. Održivi razvoj pretpostavlja da je mjera za povećanje dobrobiti, povećanje kvalitete života pojedinca i sveukupnog stanovništva, a ne povećanje proizvodnje ili potrošnje polaznog materijala. Cilj održivog razvoja je osigurati korištenje obnovljivih izvora energije na nacionalnoj i međunarodnoj razini. Svjetski čelnici su u rujnu 2015. usvojili program UN-a pod nazivom „Promijeniti svijet: program održivog razvoja do 2030.“ kojim se uspostavljaju ciljevi za zaštitu planete, okončanje siromaštva, zaštitu ljudskih prava i postizanje napretka za sve ljude. Takva odluka predstavlja pomak prema smanjenju nejednakosti u gospodarskom i

socijalnom polju te okolišnim pitanjima. Taj proces odražava europske vrijednosti socijalne pravde, demokratskog upravljanja, socijalnog tržišnog gospodarstva i zaštite okoliša. Europska unija (EU) je utvrdila posebne politike i ciljeve koji će voditi k održivom razvoju, a one uključuju: pravedan prelazak na nisko-ugljično i kružno gospodarstvo s učinkovitim korištenjem resursa; prelazak na socijalno uključivo društvo i gospodarstvo – pristojan rad i ljudska prava; prelazak na održivu proizvodnju i potrošnju hrane; ulaganje u inovacije i dugoročnu modernizaciju infrastrukture te poticanje održivog poslovanja te ostvarivanje cilja da trgovina djeluje u korist održivog razvoja na svjetskoj razini (EESC, 2015). EU je usvojila i posebnu strategiju za prehrambenu industriju, takozvanu strategiju „od polja do stola“, kojom se nastoji postići klimatska neutralnost do 2050. prelaskom s postojećeg plana prehrane na održivi model. Glavni ciljevi strategije uključuju osiguravanje dostatne i pristupačne hrane za sve, poticanje održive proizvodnje hrane smanjenjem upotrebe pesticida, antimikrobnih sredstava i gnojiva, promicanje održivije potrošnje, povećanje dobrobiti životinja i dr. (Slika 8.) (EC, 2019).



Slika 8. Glavni ciljevi europske strategije „od polja do stola“ (EC, 2019)

Zbog ovakvih strategija EU-a i svih vodećih svjetskih političkih sila postaje jako važno nastojati osigurati apsolutnu održivost cjelokupne proizvodnje. U svrhu ostvarenja ciljeva održive proizvodnje jako je važno osigurati način zbrinjavanja nusproizvoda industrije. Zbog toga se nastoji smanjiti nastajanje nusproizvoda u procesu proizvodnje ili maksimalno iskoristiti nastale nusproizvode. Industrija kave kao jedna od vodećih svjetskih industrija proizvodi velike količine bio-otpada u životnom ciklusu proizvoda, od usjeva do pripreve napitka. Biorafiniranje ovih nusproizvoda je moguće rješenje za iskorištavanje otpada uz poboljšanje ekonomskih i ekoloških aspekata proizvodnje (Janissen i Huynh, 2018). Nusproizvodi industrije kave sadrže velike količine organskog materijala što znači da im je potrebno puno kisika za razgradnju, također imaju i visok udio anti-nutrijenata (tanini, polifenoli, kofein) što im povećava toksičnost pa teško mogu koristiti za stočnu hranu ili kao dodatak za tlo (Mussatto i sur., 2011). Međutim, upravo zbog jakih antioksidacijskih svojstava, nusproizvodni kave se mogu primjenjivati u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Time se može osigurati održiva proizvodnja kave s poboljšanim ekološkim i ekonomskim aspektima.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ovog rada proveden je u tri dijela. Najprije je provedena ekstrakcija proteina i polifenola iz uzoraka srebrne pokožice kave i spektrofotometrijski je određen njihov maseni udio u ekstraktima. Zatim je u daljnjem koraku istraživanja provedena optimizacija uvjeta za mikrovalnu ekstrakciju proteina i polifenola iz srebrne pokožice kave. U završnom dijelu istraživanja je provedena analiza aminokiselina ekstrakta, dobivenih optimalnih uvjetima mikrovalne ekstrakcije.

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci srebrne pokožice kave

U ovom istraživanju korišteni su uzorci srebrne pokožice kave dobiveni od Franck d. d., hrvatske tvrtke za proizvodnju kave, čaja i snack proizvoda iz Zagreba. Uzorci su dobiveni u obliku briketa, a sadrže mješavinu dvije vrste kave - *C. arabica* i *C. robusta*. Briketi nastaju kao nusproizvodi iz pržionika kave, a zbog lakšeg provođenja analiza usitnjeni su u prah pomoću kuhinjskog štapnog miksera. Pregledom literature, na temelju istraživanja koje su proveli Wen i sur. (2019), pripremljeni su uzorci koji sadrže 10,0000 g pokožice kave i deioniziranu vodu u omjeru 1:50 (w/v). Sve analize uzoraka provedene su u dvije paralele.

3.1.2. Kemikalije i standardi

1. Destilirana voda (PBF, Zagreb, Hrvatska)
2. Aceton (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
3. Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
4. Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)
5. Reagens A: 2 % Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH
6. Reagens B: 0,5 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ u 1 % K, Na- tartaratu
7. Reagens C:
8. Galna kiselina, (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
9. AccQ•Fluor Reagent Kit (Waters, Milford, SAD)
10. AccQ•Fluor Ultra Eluent A Concentrate, (Waters, Milford, SAD)
11. Acetonitrile (ACN), (VWR Chemicals, Radnor, SAD)
12. Amino acid standard H, (Waters, Milford, SAD)
13. Amonijev bikarbonat, (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

14. Fenol, (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
15. Gel filtration standards, (BioRad, Hercules, SAD)
16. Klorovodična kiselina, (VWR Chemicals, Radnor, SAD)
17. Metanol, (Honeywell, Wabash, SAD)
18. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, (Merck, Burlington, SAD)
19. Natrijev deoksikolat, (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
20. Peptidi za kalibriranje instrumenta ProteoMass MALDI calibration kit, (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
21. Trietilamonij bikarbonat (1M), (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
22. Trifluorooctena kiselina (TFA), (Merck, Burlington, SAD)
23. Triklorooctena kiselina, (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
24. Tripsin, (Promega, Madison, SAD)
25. Tetrahidrofuran, (Merck, Burlington, SAD)
26. α -cijano-4-hidroksi-cimetna kiselina (CHCA), (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

1. Centrifuga (Rotina 35, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka)
2. Analitička vaga (NBL-254i, Nimbus Analytical Balances, Oxford, SAD)
3. UV/VIS spektrofotometar (Lambda 25, PerkinElmer, Waltham, SAD)
4. Vortex tresilica (Dlab, MX-S, Peking, Kina)
5. Magnetska miješalica (Dlab, MS-H-S, Peking, Kina)
6. Uređaj za mikrovalnu laboratorijsku ekstrakciju (StartSYNTH, Milestone Srl., Sorisole, Italy)
7. Autoflex Speed MALDI TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka)
8. Agilent 1260 Infinity, G1311B, Binary pump, Fluorescent detector (Agilent, Santa Clara, SAD)
9. Vakuum Concentrator plus (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

10. Reacti-therm 3 Heat (Thermo Scientific, Waltham, SAD)
11. Synergy® Water Purification System (Merck Millipore, Burlington, SAD)

Pribor:

1. Odmjerne tikvice (5 mL, 10 mL, 50 mL, 100 mL, 1000 mL)
2. Staklene tikvice s okruglim dnom (250 mL)
3. Plastične lađice za vaganje
4. Büchnerov lijevak
5. Plastične epruvete (Falcon) (50 mL)
6. Stakleni lijevci
7. Staklene kivete
8. Mikropipete Eppendorf (100 μ L, 1000 μ L, 5 mL)
9. Staklene epruvete
10. Stalak za epruvete
11. Staklene čaše (50 mL, 100 mL, 250 mL)
12. Špatula
13. Menzura (50 mL)
14. Celulozni filter papir
15. Plastično sito za prosijavanje
16. Laboratorijska žlica
17. Staklene pipete (10 mL, 25 mL)
18. Propipete

3.2. METODE

3.2.1. Mikrovalna ekstrakcija (MW)

Provedena je mikrovalna ekstrakcija uzoraka srebrene pokožice kave uz deioniziranu vodu kao otapalo. Ekstrakcija je provedena na uređaju za mikrovalnu laboratorijsku sintezu StartSYNTH, Milestone, Italy (Slika 9).



Slika 9. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju (vlastite fotografije)

Prije same ekstrakcije napravljen je dizajn eksperimenta u programu STATGRAPHICS Centurion (StatPoint technologies, Inc., VA 20186, USA). Eksperiment je organiziran u faktorijalnom dizajnu, gdje su nezavisne varijable snaga i vrijeme tretiranja. Snaga je varirana u vrijednostima 100, 150 i 200 MW, a vrijeme 3, 6 i 9 minuta te je dobiveno 9 uzoraka ekstrakata (Tablica 2.). Svaka ekstrakcija je provedena u duplikatima, pa je ukupno provedeno 18 ekstrakcija.

Nakon ekstrakcije dobiveni rezultati su obrađeni u istom programu. Pomoću STATGRAPHICS-a je napravljena analiza varijanci (ANOVA) kojom je određena statistička značajnost parametara snage i vremena na vrijednosti ukupnih proteina i polifenola. Kao statistički značajni parametri uzeti su oni čija je p-vrijednost $< 0,05$. Također su izrađeni dijagrami odzivnih površina eksperimentalnih podataka te jednadžbe eksperimentalnih modela. Provedena je i optimizacija ekstrakcije u kojoj su određeni optimalni parametri ekstrakcije.

Tablica 2. Dizajn eksperimenta optimiranja uvjeta mikrovalne ekstrakcije

Oznaka uzoraka	Snaga (W)	Vrijeme (min)
M1	100	6
M2	200	9
M3	100	9
M4	200	3
M5	200	6
M6	150	6
M7	150	9
M8	100	3
M9	150	3

Postupak ekstrakcije:

U staklenu tikvicu s okruglim dnom odvaži se $10,0000 \pm 0,0001$ g uzorka srebrene pokožice kave, koji je prethodno usitnjen i prosijan. U tikvicu se dodaje 100 mL deionizirane vode te magnet za miješanje. Tikvica s uzorkom se smješta u uređaj za mikrovalnu ekstrakciju. Na upravljačkoj ploči uređaja namještaju se željeni parametri (vrijeme i snaga). Nakon završetka ekstrakcije, dobiveni ekstrakt se filtrira preko Büchnerovog lijevka i prikuplja u Falcon epruvete za daljnje analize.

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola

Princip metode:

Metoda spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u vodenom ekstraktu temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim reagensom. U reakciji Folin-Ciocalteu reagens, koji je smjesa fosfomolibden i fosfomolibden kiseline, reagira s fenoksid-ionom iz uzorka. Pri tome se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reducira do volfram i molibden oksida, koji su plavo obojeni. Intenzitet plavog obojenja se odredi spektrofotometrijski pri 765 nm (Shortle i sur., 2014) spektrofotometrom (Lambda 25, UV/VIS spektrofotometar). Intenzitet plavog obojenja je upravo proporcionalan koncentraciji polifenola u uzorku.

Priprema uzorka:

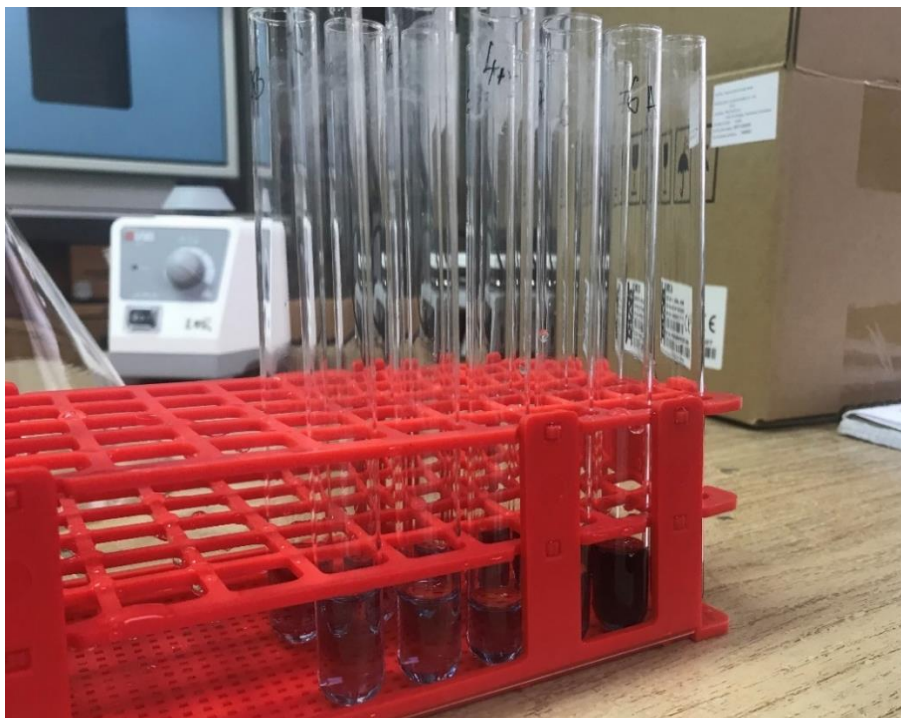
Dobiveni ekstrakt se razrijedi s vodom dva puta prije određivanja ukupnih polifenola.

Postupak određivanja:

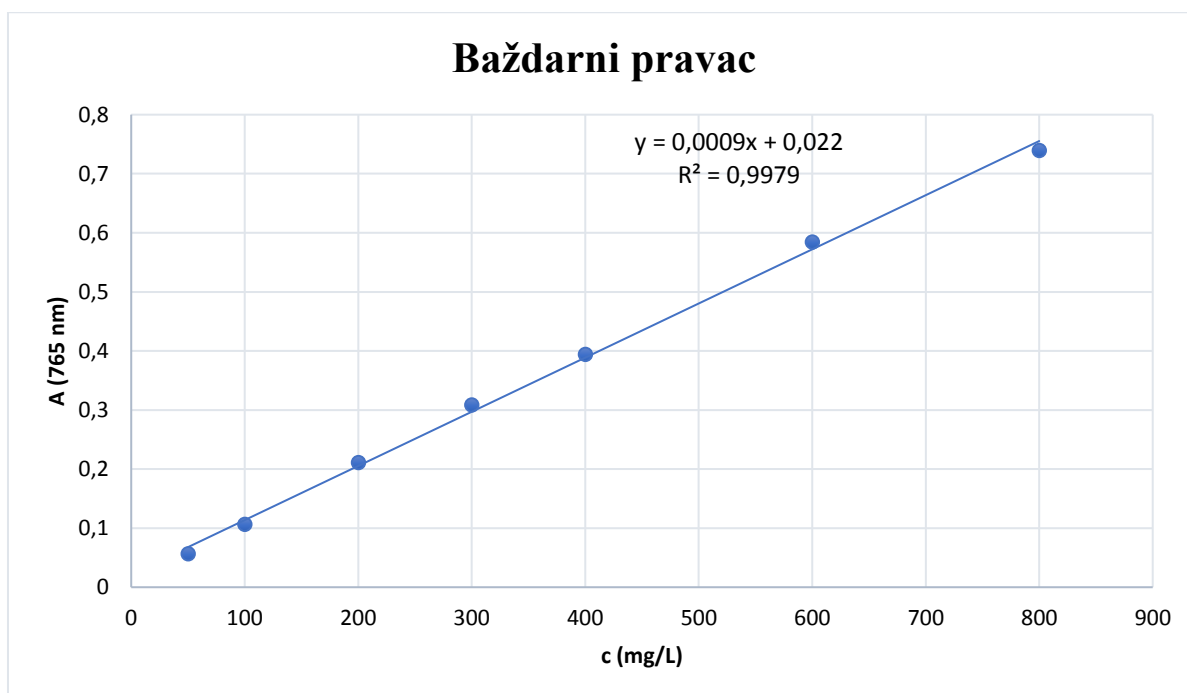
U staklenu epruvetu redom se otpipetira 0,1 mL uzorka (razrijeđenog ekstrakta), 7,9 mL destilirane vode te 0,5 mL Folin- Ciocaliteau reagensa, koji je prethodno razrijeđen s vodom u omjeru 1 : 2. Dobivena smjesa se promiješa se i doda joj se 1,5 mL 20 %-tne otopine natrijeva karbonata (Na_2CO_3). Sadržaj epruvete se ponovno dobro promiješa na Vortex uređaju. Pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbanacija plavog obojenja smjese pri 765 nm u odnosu na slijepu probu (slika 10). Slijepa proba se pripremi na isti način kao i ispitivani uzorci, ali se pritom umjesto uzorka u reakcijsku smjesu dodaje 0,1 mL destilirane vode.

Baždarni dijagram:

Otopina standarda galne kiseline poznate koncentracije 1000 mg/L razrjeđuje se vodom u određenim omjerima kako bi se dobile otopine koncentracija 50, 100, 200, 300, 400, 600 i 800 mg/L. Nakon toga se provodi prethodno opisani postupak određivanja polifenola, uz to da se u prvom koraku umjesto 0,1 mL uzorka dodaje 0,1 mL pripremljenih otopina galne kiseline (Slika 10). Izmjeri se apsorbanacija pri 765 nm (A_{765}). Iz dobivenih vrijednosti apsorbanacije i poznatih koncentracija otopina galne kiseline izrađuje se baždarni dijagram. Koncentracije otopina galne kiseline nanose se na apscisu, a vrijednost apsorbanacije na ordinatu. Pomoću programa Microsoft Excel izradi se baždarni dijagram i dobije se jednadžba pravca (Slika 11). U daljnjim mjerenjima koncentracija ukupnih fenola se izračunava koristeći jednadžbu pravca.



Slika 10. Uzorci standarda galne kiseline za izradu baždarnog dijagrama (vlastita fotografija)



Slika 11. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije (A_{765}) o koncentraciji galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi: $Y = 0,0009x + 0,022$ ($R^2 = 0,9979$)
gdje je:

$Y - A_{765}$

X – koncentracija galne kiseline (mg/L)

R^2 – koeficijent determinacije

Koncentracije ukupnih fenola izražene su u mg (ekvivalent galne kiseline-EGK) u 1 L ekstrakta, kao srednja vrijednost dvaju mjerenja. Dok su konačni rezultati izraženi kao mg EGK po gramu uzorka osušene srebrne pokožice kave.

3.2.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry- u

Princip metode:

Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u provodi se spektrofotometrijski. Metoda se temelji na reakciji Cu^{2+} sa peptidnim vezama proteina u lužnatom mediju, gdje dolazi do redukcije Cu^{2+} u Cu^+ . Zatim se u reakcijsku smjesu dodaje Folin-Ciocalteu reagens koji reagira sa Cu^+ -protein kompleksom i s pobočnim lancima tirozina, triptofana i cisteina stvarajući najprije nestabilni kompleks, koji se postepeno reducira i daje plavo obojenje otopine.

Priprema uzorka:

10 mL ekstrakta se otpipetira u Falcon epruvetu te se doda 40 mL acetona kako bi se istaložili proteini. Zatim se Falcon epruveta pohranjuje kroz 15 minuta pri $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Potom se uzorak temperira na sobnu temperaturu i centrifugira pri 10000 okretaja / 10 minuta. Supernatant se odvoji od taloga dekantiranjem. Talog se potom ispiri sa 10 mL acetona i zatim otopi u 10 mL destilirane vode. Tako dobiveni uzorci se razrijede pet puta prije određivanja koncentracije proteina.

Priprema otopina:

Priprema zasićene otopine natrijeva karbonata (20 %-tna otopina): u 800 mL vruće destilirane vode otopi se 200 g anhidrida natrijeva karbonata, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

Priprema reagensa A: odvagati 1,0000 g natrijeva hidroksida i kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 250 mL, te otopiti u maloj količini destilirane vode. Odvagati 5,0000 g anhidrida natrijeva karbonata i kvantitativno prenijeti u otopinu natrijeva hidroksida, otopiti i

promiješati otopinu te nadopuniti odmjernu tikvicu do oznake destiliranom vodom.

Priprema reagensa B: odvagati 0,0500 g bakrova(II) sulfata pentahidrata i kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 10 mL i otopiti u maloj količini destilirane vode. Odvagati 0,1000 g K, Na- tartarata i kvantitativno prenijeti u otopinu bakrova(II) sulfata pentahidrata, otopiti, promiješati i nadopuniti do oznake destiliranom vodom.

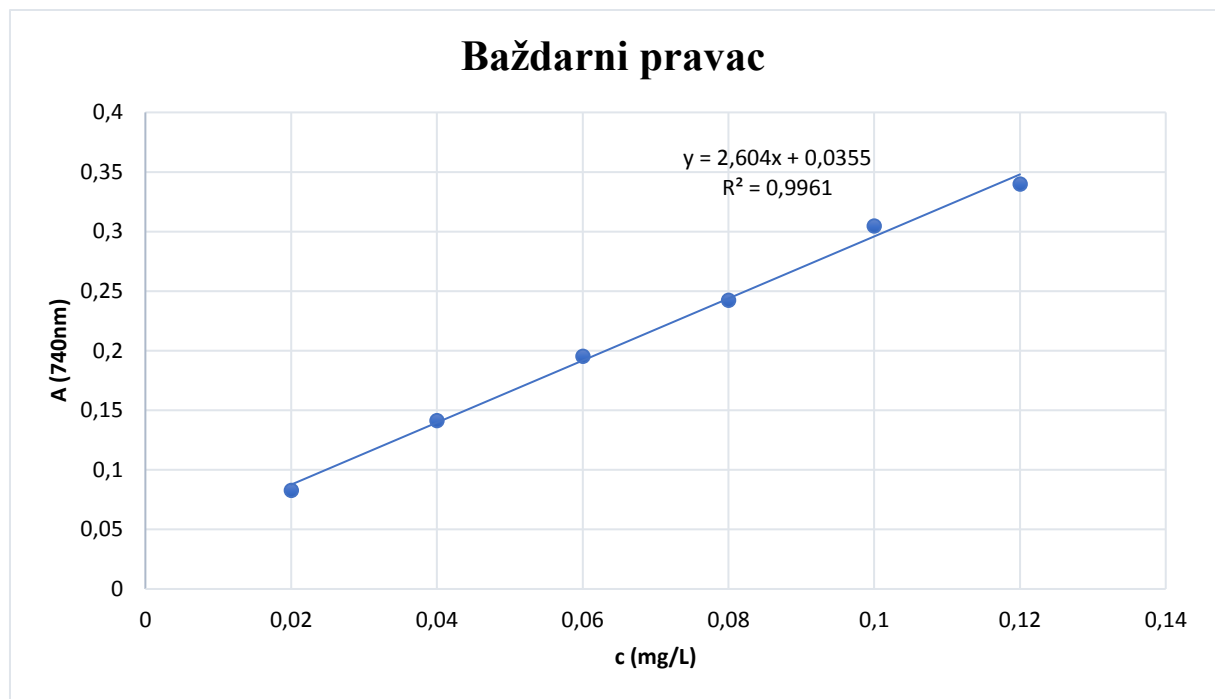
Priprema reagensa C: u odmjernu tikvicu od 50 mL otpipetirati 50 mL reagensa A i 1 mL reagensa B te promiješati.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu se otpipetira 0,4 mL uzorka i 2 mL reagensa C te se sadržaj promiješa i inkubira na sobnoj temperaturi 10 – 15 minuta. Potom se u ovu epruvetu naglo dodaje 0,2 mL Folin-Ciocalteu reagensa uz miješanje na Vortexu. Sadržaj epruvete se zatim inkubira na sobnoj temperaturi 40 do 60 minuta. Apsorbancija se mjeri na valnoj duljini elektromagnetskog zračenja od 740 nm (spektrofotometar Lambda 25, UV/VIS). Kod pripreme slijepe probe slijedi se isti postupak, ali se umjesto uzorka u reakcijsku smjesu dodaje 0,4 mL destilirane vode.

Baždarni dijagram:

Iz standardne otopine proteina koncentracije 200 mg / mL, u odmjernu tikvicu od 10 mL pripreme se otopine poznate koncentracije proteina 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1 i 0,12 mg/L. Nakon toga se provodi prethodno opisani postupak i mjerenje apsorbancije u uzorcima poznatih koncentracija. Pomoću programa Microsoft Excel izrađuje se baždarni dijagram. Na apscisi se nalaze poznate koncentracije proteina, a na ordinati vrijednost izmjerenih apsorbancija pri 740 nm (A_{740}). Iz dijagrama se dobije i jednažba pravca pomoću koje se izračunava koncentracija proteina u uzorcima ekstrakta (Slika 12).



Slika 12. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije (A_{740}) o koncentraciji proteina

Na temelju dobivenih rezultata, jednađba pravca glasi: $Y = 2,604X + 0,0355$ ($R^2 = 0,9961$)

gdje je:

$Y - A_{740}$

$X -$ koncentracija proteina (mg/L)

$R^2 -$ koeficijent determinacije

3.2.4. Analiza aminokiselina

Kvantitativna analiza aminokiselina provedena je koristeći metodu Waters AccQ•Tag prema uputama proizvođača (Waters, Milford, SAD), a obuhvaća hidrolizu, derivatizaciju aminokiselina s AccQ•Fluor derivatizacijskim reagensom AccQ•Fluor Reagent te HPLC kvantitativnu analizu.

3.2.4.1. Hidroliza proteina

Pet (5) μL svakog uzorka upareno je do suha u vakuum koncentratoru. Talog je otopljen u 200 μL 6 M HCl uz dodatak 4% fenola. Hidroliza je provedena tijekom 24 sata pod vakuumom pri 114 °C. Dobiveni hidrolizat je uparen do suha u vakuum koncentratoru pri 60 °C.

3.2.4.2. Derivatizacija aminokiselina

Nakon sušenja, uzorak je otopljen u 20 μL 20 mM HCl. Derivatizacija aminokiselina je provedena koristeći AccQ•Fluor Reagent prema uputama proizvođača (Waters AccQ•Tag Chemistry Package Instruction Manual). Nakon derivatizacije, uzorci su filtrirani kroz filter veličina pora 0,2 μm . Standardna otopina aminokiselina koncentracije 2,5 mM je razrijeđena do koncentracije od 100 pmol/ μL .

3.2.4.3. Kvantitativna HPLC analiza

Separacija derivatiziranih aminokiselina je provedena prema metodi opisanoj u Tablici 3.

Tablica 3. HPLC metoda korištena za kvantitativnu analizu aminokiselina

Uvjeti kromatografske separacije i eluacije	Kolona:	Waters AccQ•Tag, 3.9x150 mm	
	Volumen injekt. uzorka:	1 µL	
	Volumen injekt. standarda:	5 µL	
	Detekcija: ekscitacija:	250 nm, emisija: 395 nm	
	Protok mobilne faze	1.0 mL/min	
	Mobilna faza A:	Waters AccQ•Tag eluent A	
	Mobilna faza B:	Acetonitril/Milli-Q voda = 60/10 (v/v)	
	Temperatura kolone:	37 °C	
	Gradijentna elucija:		
	Vrijeme (min)	% Mobilna faza A	% Mobilna faza B
	0,0	98,0	2,0
	0,5	98,0	2,0
	15,0	93,0	7,0
	19,0	90,0	10,0
Standard	28,0	74,0	26,0
	35,0	67,0	33,0
	36,0	67,0	33,0
	37,0	0,0	100,0
	45,0	0,0	100,0
	46,0	98,0	2,0
	52,0	90,0	2,0
	Smjesa derivatiziranih aminokiselina (amino acid standard H mixture, Waters) u koncentraciji 100 pmol/µL		

3.2.5. Gel filtracijska kromatografija (eng. size exclusion chromatography), SEC-HPLC analiza

Separacija proteina provedena je koristeći parametre opisane u Tablici 4.

Tablica 4. SEC-HPLC metoda korištena pri separaciji proteina na temelju njihove veličine

Uvjeti kromatografske separacije i elucije	Kolona:	3 μm, 4,6 x 300 mm, BioSec-3, Agilent	
	Volumen injekt. uzorka:	10 μL	
	Volumen injekt. standarda:	5 μL	
	Detekcija:	215	
	Protok mobilne faze:	0,3 mL/min	
	Mobilna faza:	145 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0	
	Temperatura kolone:	20 °C	
	Elucija:	Izokratna	
Standard	Smjesa proteina poznate molekulska mase korištena za određivanje molekulske mase uzoraka:		
	Protein	Molekulska masa (kDa)	RT (min)
	tireoglobulin	670	6,890
	γ-globulin	158	
	ovalbumin	44	7,538
	mioglobin	17	8,268
	Vitamin B12	1,35	12,226

RT (eng. *retention time*), retencijsko vrijeme

3.2.6. Natrijev dodecil sulfat – elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (eng. *sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS- PAGE)

3.2.6.1. Ekstrakcija i taloženje proteina

U uzorak volumena 1260 μ L dodano je 15 μ L 10 % vodene otopine natrijevog deoksikolata te 225 μ L 50 % vodene otopine trikloroctene kiseline. Proteini su taloženi na ledu tijekom 2 h te izdvojeni centrifugiranjem pri $10000 \times g$ tijekom 10 min pri 4 °C (Tehtnica Centric 200R, Domel, d.o.o. Slovenija). Talog je ispran dva puta s koncentriranim ledenim tetrahidrofuranom. Naposljetku, talog je otopljen u 50 μ L 50 mM trietilamonijevog bikarbonata.

3.2.6.2. SDS-PAGE

Separacija proteina provedena je koristeći Invitrogen™ Novex™ Tris-Glycine, 4 - 12%, 1,5 mm gel prema uputama proizvođača (Fisher Scientific, 2019). Otopina za fiksiranje gelova pripravljena je miješanjem 250 mL metanola i 50 mL octene kiseline u odmjernoj tikvici od 500 mL koja je nadopunjena deioniziranom vodom do oznake. Otopina Coomassie brilliant blue alkoholne boje za bojanje gelova pripravljena je otapanjem 0,125 g boje Coomassie brilliant blue G250 u 100 mL deionizirane vode. U tako pripravljenu otopinu dodano je 125 mL metanola i 25 mL octene kiseline. U odmjernoj tikvici od 100 ml pripravljena je otopina za odbojavanje, miješanjem 7 mL ledene octene kiseline i 10 mL metanola uz dopunjavanje deioniziranom vodom do oznake.

Gel je inkubiran u otopini za fiksiranje kroz jedan sat, a zatim u Coomassie brilliant blue otopini tijekom 10 minuta. Otopina za bojanje se potom odbacuje, a gel se inkubira u otopini za odbojavanje pri sobnoj temperaturi do obezbojenja pozadine.

3.2.6.3. Digestija proteina u gelu

Digestija proteina u gelu i priprema uzoraka za spektrometriju masa provedena je prema protokolu opisanom u Shevchenko i sur., (1996).

3.2.6.4 Analiza peptida spektrometrijom masa

Analiza peptida provedena je uz pomoć MALDI-TOF/TOF (eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight*) spektrometra masa (eng. *mass spectrometry*, MS) Autoflex Speed (Bruker, Njemačka) s parametrima opisanima u Prilogu 1 - Parametri MS/MS analize peptida spektrometrom masa.

3.2.6.5. Identifikacija peptida/proteina

Nakon snimanja MS i MS/MS spektara, dobiveni podaci su korišteni za identifikaciju peptida tj. proteina kroz njihovu usporedbu sa spektrima u dostupnim bazama podataka uz pomoć programa ProteinScape, verzija 3.0 (Bruker, Njemačka). Kreirana je *in house* baza podataka spektara proteina *Coffea canephora*. Sekvence odgovarajućih proteina preuzete su iz UniProt baze podataka (26073 unosa, <https://www.uniprot.org/>, pristupljeno 26.02.2021.).

3.2.7. Statistička obrada rezultata

Prije istraživanja napravljen je dizajn eksperimenta (poglavlje 3.2.1. u ovom radu) u programu STATGRAPHICS 19 (Statgraphics Technologies, Inc., Virginia, SAD). U istom programu napravljena je i statistička obrada izmjerenih rezultata masene koncentracije ukupnih polifenola i proteina.

Prilikom optimizacije parametara ekstrakcije nezavisne varijable su bile vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 minuta) i snaga (100, 150 i 200 W) MW-a, a zavisne varijable udio ukupnih polifenola (mg/100 g) i koncentracija ukupnih proteina (mg/L) u ekstraktu. Korištena je analiza varijanci (ANOVA) za utvrđivanje odstupanja u provedenim tretmanima. Parametri su imali statistički značajan utjecaj ako je $p < 0,05$.

Rezultati analize proteina i aminokiselina su obrađeni u programu Microsoft Office Excel 2013.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju najprije je provedena mikrovalna ekstrakcija (MW) ukupnih polifenola i proteina iz uzoraka srebrne pokožice kave, koji su prethodno usitnjeni i prosijani radi lakše manipulacije s uzorcima i bolje ekstrakcije. Kao otapalo za ekstrakciju odabrana je deionizirana voda kao jeftino, lako dostupno te tehnološki i ekološki prihvatljivo otapalo. Potom je spektrofotometrijski određen maseni udio polifenola i koncentracija proteina u ekstrakcijom dobivenim uzorcima. Rezultati analize su potom obrađeni u MS Excelu i prikazani tabelarno kao srednje vrijednost dvaju paralelnih mjerenje s pripadajućom standardnom pogreškom.

U drugom dijelu istraživanja napravljena je optimizacija uvjeta mikrovalne ekstrakcije. Pritom su varirani parametri ekstrakcije - vrijeme (3, 6 i 9 minuta) i snaga (100, 150 i 200 W) MW-a, a temperatura postupka ekstrakcije nije prelazila 40 °C zbog moguće denaturacije bioaktivnih komponenti. Podaci su obrađeni pomoću programa STATGRAPHICS i prikazani u obliku tablica i grafova.

Na kraju je provedena analiza proteina i aminokiselina iz uzoraka ekstrakata SDS-PAGE metodom kao i spektrometrijom masa (MALDI-TOF/TOF). Rezultati su prikazani u obliku tablica i kromatograma.

4.1. Utjecaj mikrovalne ekstrakcije na udio ukupnih polifenola u uzorcima

Tablica 5. prikazuje rezultate određivanja udjela ukupnih polifenola u uzorcima ekstrakata srebrne pokožice kave tretiranih mikrovalovima.

Tablica 5. Prikaz ukupnog udjela polifenola u uzorcima srebrne pokožice kave (SPK) tretiranih mikrovalovima

Oznaka uzorka	Vrijeme tretiranja [min]	Snaga [W]	Ukupni polifenoli [mg EGK/100 g]
M1	6	100	591,8639 ± 0,10
M2	9	200	646,7556 ± 0,06
M3	9	100	556,3969 ± 0,04
M4	3	200	568,8472 ± 0,02
M5	6	200	559,8778 ± 0,15
M6	6	150	677,8111 ± 0,03
M7	9	150	611,7861 ± 0,11
M8	3	100	617,0333 ± 0,09
M9	3	150	653,9917 ± 0,06

*EGK – ekvivalent galne kiseline

Vrijednost masenog udjela ukupnih polifenola kretala se u rasponu od 556,3969 ± 0,04 mg EGK/100 g do 677,8111 ± 0,03 mg EGK/100 g. Najveći maseni udio polifenola (677,8111 ± 0,03 mg EGK/100 g) imao je uzorak M6 koji je tretiran 6 minuta mikrovalovima snage 150 W. To je neočekivan rezultat, budući da je očekivano da bi uzorak koji je tretiran najduže i s najvećom snagom (M2) trebao imati najveći udio (Wen, 2019). Međutim, uzorak M2 imao je maseni udio polifenola od 646,7556 ± 0,06 mg EGK/100 g, što je tek treća po redu najveća dobivena vrijednost. Drugi najbolji rezultat pokazao je uzorak M9 (653,9917 ± 0,06 mg EGK/100 g), koji je tretiran 3 minute snagom mikrovalova od 150 W. Najniži maseni udio polifenola imao je uzorak M3 (556,3969 ± 0,04 mg EGK/100 g), koji je tretiran 9 minuta, najnižom snagom mikrovalova od 100 W. Takav rezultat je očekivan zbog najniže korištene

snage mikrovalova, ali ne i zbog dugog vremena tretiranja. S druge strane, za uzorak M8 koji je tretiran najkraće (3 minute) s najnižom snagom mikrovalova (100 W), očekivao se najniži udio ukupnih polifenola, ali je dobiveni rezultat od $617,0333 \pm 0,09$ mg EGK/100 g bio četvrti po redu od najviših dobivenih udjela.

Wen i sur. (2019) proveli su mikrovalnu ekstrakciju polifenola iz srebrne pokožice kave uz deioniziranu vodu kao otapalo. Parametri ekstrakcije u tom istraživanju bili su nešto drugačiji, vrijeme ekstrakcije bilo je 4, 8 i 12 minuta, a snaga mikrovalova 196,9 W; 302,4 W te 434,7 W. U tom istraživanju najveći maseni udio ekstrahiranih polifenola je bio $600 \pm 0,14$ mg EGK/100 g, što je niži rezultat od u ovom istraživanju dobivenog maksimalnog udjela polifenola ($677,8111 \pm 0,03$ mg EGK/100 g). Posebno je značajno da su Wen i sur. (2019) takav rezultat postigli pri vremenu ekstrakcije od 12 minuta i snazi mikrovalova od 434,7 W, dok je maksimalna vrijednost u ovom istraživanju postignuta pri kraćem vremenu tretiranja od 6 minuta i s manjom snagom mikrovalova od 150 W. Pri tretiranju mikrovalovima snage 196,9 W i najkraćem trajanju ekstrakcije od 4 minute, Wen i sur. (2019) su postigli minimalnu vrijednost udjela ukupnih polifenola nižu od 350 mg EGK/100 g, što je značajno niži rezultat od svih dobivenih udjela polifenola u ovom istraživanju.

Mussatto (2015) je proveo kruto-tekuću ekstrakciju polifenola iz uzoraka srebrne pokožice kave uz korištenje različitih otapala. Najveća masena koncentracija polifenola (130 mg EGK/100 g) u ekstraktima postignuta je ekstrakcijom s 60%-tnim etanolom kao otapalom. Vrijeme ekstrakcije bilo je 30 minuta, a ekstrakcijska smjesa je temperirana na temperaturi od 60 – 65 °C. U istom istraživanju provedena je i kruto-tekuća ekstrakcija polifenola s deioniziranom vodom, otopinom 0,1 M HCl i otopinom 0,1 M NaOH kao otapalom, pri temperaturama od 25 – 80 °C. Korištenjem ovih otapala postignuti su znatno niži maseni udjeli polifenola od 500 – 800 mg EGK/100 g. Najviši rezultat je postignut s otopinom 0,1 M NaOH kao otapalom, pri temperaturi od 80 °C, a najniži s otopinom 0,1 M HCl pri 25 °C.

Veliku važnost za uspješnost ekstrakcije ima odabir otapala, budući da je važno da otapalo dobro otapa ciljane spojeve koji se ekstrahiraju, a ne otapa ostale prisutne tvari u uzorku. Povećanje temperature pospješuje ekstrakciju, ali pri velikim temperaturama može doći i do razgradnje termolabilnih spojeva. Također pri ekstrakciji mikrovalovima važni parametri su jačina i frekvencija mikrovalova, duljina trajanja ekstrakcije, izvedba uređaja za mikrovalnu ekstrakciju, veličina čestica i sastav uzorka (Chan i sur., 2011).

Kod kolorimetrijskog određivanja polifenola, u reakciji s Folin-Ciocalteu-ovim reagensom mogu reagirati i druge tvari osim fenola, pa tako može doći do nepreciznih rezultata. Stoga bi rezultate kolorimetrijske metode trebalo poduprijeti preciznijim analizama poput nuklearne

magnetne rezonance (eng. *nuclear magnetic resonance*, NMR) ili spregnutim sustavom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti - tandemne spektrometrije masa (eng. *high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, HPLC-MS/MS).

4.1.1 Statistička obrada rezultata ekstrakcije ukupnih polifenola

Tablica analize varijanci razdvaja varijabilnost udjela ukupnih proteina u odvojene dijelove, za svaki od faktora. Pomoću tablice analize varijanci može se zaključiti koji parametri procesa su statistički značajni, odnosno promjena kojih parametara značajno utječe na promjenu rezultata eksperimenta. Faktori koji imaju p-vrijednost $< 0,05$ smatraju se statistički značajni. Iz tablice 6 vidimo da za eksperimentalne podatke ekstrakcije ukupnih polifenola ni jedan od ispitivanih faktora (snaga mikrovalova i vrijeme ekstrakcije) ne pokazuje statističku značajnost ($p > 0,05$). Ispitan je i utjecaj međuodnosa nezavisnih varijabli (AA, AB, BB), koji se također nije pokazao statistički značajan ($p > 0,05$). Durbin-Watson statistika testira postoji li serijska korelacija u rasporedu kojim se pojavljuju rezultati, budući da je $p > 5\%$, nema korelacije u rasporedu rezultata.

Tablica 6. Analiza varijanci (ANOVA) za ukupne polifenole

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupnjevi slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>p-vrijednost</i>
A:Snaga	17,2941	1	17,2941	0,01	0,9139
B:Vrijeme	103,614	1	103,614	0,08	0,7923
AA	6666,39	1	6666,39	5,33	0,1042
AB	4798,67	1	4798,67	3,83	0,1451
BB	1,02474	1	1,02474	0,00	0,9790
Ukupna pogreška	3754,72	3	1251,57	/	/
Ukupna pogreška (ispravljeno)	15341,7	8	/	/	/

R-kvadrat = 75,5261 %

R-kvadrat (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 34,7362 %

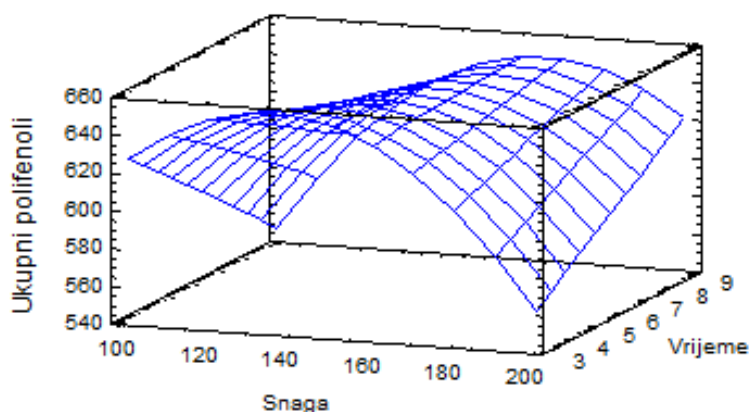
Standardna pogreška, procjena = 35,3776

Srednja vrijednost apsolutne pogreške = 16,4578

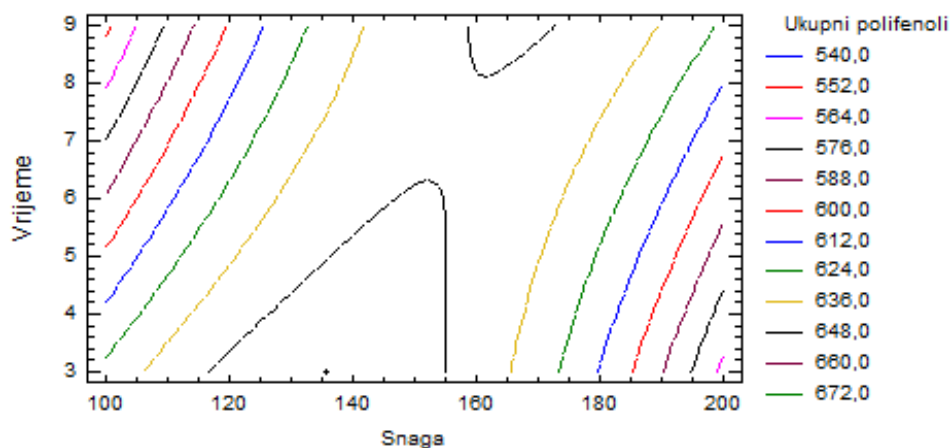
Durbin-Watson statistika = 2,11661 (P=0,8175)

Lag 1 rezidual autokorelacija = -0,0669317

Slike 13. i 14. slikovito prikazuju rezultate statističke obrade vrijednosti ekstrahiranih ukupnih polifenola. Iz prikaza možemo zaključiti da snaga mikrovalova ni vrijeme ekstrakcije nemaju statistički značajan utjecaj na ekstrakciju ukupnih polifenola. Ovakvi dijagrami mogu služiti za planiranje budućih eksperimenata budući da prikazuju brzu promjenu koncentracije ekstrahiranih proteina s promjenama snage i vremena.



Slika 13. Prikaz odzivne površine za ekstrakciju ukupnih polifenola



Slika 14. Konturni dijagram odzivne površine za ekstrakciju ukupnih polifenola

Tablica 7 prikazuje predviđene vrijednosti ukupnih polifenola za određene vrijednosti snage mikrovalova i vremena ekstrakcije. U tablici je iznos snage mikrovalova mijenjan za 1,0 W te se prikazuje kako male promjene jednog od parametara mogu utjecati na promjenu rezultata masene koncentracije ukupnih polifenola. Iz polinoma odnosno regresijske jednadžbe također vidimo utjecaj pojedinih parametara na vrijednost masene koncentracije ukupnih polifenola. To

nam omogućuje okvirno računanje vrijednosti masene koncentracije ukupnih polifenola za buduće eksperimente, ovisno o parametrima. Na taj način možemo podešavati parametre ekstrakcije u cilju dobivanja željenih rezultata.

Tablica 7. Predviđena vrijednost masene koncentracije ukupnih polifenola prema postavljenom modelu eksperimenta

		<i>Predviđeno</i>
<i>Snaga</i>	<i>Vrijeme</i>	<i>Masena koncentracija ukupnih polifenola (mg EGK/100 g)</i>
150,0	6,0	648,34
151,0	5,89488	648,471
152,0	5,97262	648,341
153,0	6,00857	648,228
154,0	6,02587	648,094
155,0	6,03362	647,925

Regresijska jednadžba eksperimentalnog modela koja je prilagođena eksperimentalnim podacima:

$$\text{Masena koncentracija ukupnih polifenola} = 336,907 + 5,57657 \cdot A - 35,067 \cdot B - 0,0230935 \cdot A^2 + 0,230908 \cdot A \cdot B - 0,0795333 \cdot B^2,$$

gdje su A-snaga mikrovalova i B-vrijeme ekstrakcije.

U tablici 8 izračunati su optimalni parametri mikrovalne ekstrakcije polifenola, koji iznose 135,74 W i 3,0 minute. Optimalna vrijednost masene koncentracije ukupnih polifenola je 656,478 mg EGK/100 g.

Tablica 8. Prikaz rezultata optimizacije

<i>Faktor</i>	<i>Najviše</i>	<i>Najniže</i>	<i>Optimalno</i>
Snaga	100,0	200,0	135,74
Vrijeme	3,0	9,0	3,0
Optimalna vrijednost:	656,478		

4.2. Utjecaj mikrovalne ekstrakcije na udio ukupnih proteina u uzorcima

U tablici 9. prikazane su dobivene koncentracije ukupnih proteina u ekstraktima uzoraka srebrne pokožice kave.

Tablica 9. Prikaz koncentracije proteina u uzorcima SPK tretiranih mikrovalovima

Oznaka uzorka	Vrijeme tretiranja [min]	Snaga [W]	Ukupni proteini [mg/L uzorka]
M1	6	100	0,5215 ± 0,01
M2	9	200	0,7734 ± 0,07
M3	9	100	0,5213 ± 0,08
M4	3	200	0,5912 ± 0,01
M5	6	200	0,6622 ± 0,06
M6	6	150	0,5926 ± 0,16
M7	9	150	0,6885 ± 0,01
M8	3	100	0,5286 ± 0,00
M9	3	150	0,5742 ± 0,00

Vrijednosti koncentracije ukupnih proteina se kreću u rasponu od $0,5213 \pm 0,08$ mg/L do $0,7734 \pm 0,07$ mg/L. Najveću vrijednost koncentracije ukupnih proteina ($0,7734 \pm 0,07$ mg/L) ima uzorak M2 koji je tretiran 9 minuta, mikrovalovima snage 200 W. Takav rezultat je i očekivan budući da se radi o uzorku koji je tretiran najdulje (9 minuta) najvećom primijenjenom snagom mikrovalova (200 W). Drugi najbolji rezultat ($0,6885 \pm 0,01$ mg/L) je pokazao uzorak M7, koji

je tretiran snagom od 150 W u trajanju od 9 minuta. Sličnu vrijednost $0,6622 \pm 0,06$ mg/L imao je uzorak M5 tretiran 6 minuta, snagom 200 W. Ostali uzorci pokazali su nešto niže vrijednosti koncentracije ukupnih proteina, raspona od $0,5213 \pm 0,08$ mg/L do $0,5926 \pm 0,16$ mg/L. Sva tri uzorka (M1, M3 i M8) tretirana snagom mikrovalova od 100 W pokazala su gotovo jednake koncentracije proteina od $0,5213 \pm 0,08$ mg/L do $0,5286 \pm 0,00$ mg/L. To pokazuje da se pri primjeni niske snage mikrovalova produljenjem trajanja ekstrakcije značajno ne povećava udio ekstrahiranih proteina.

Wen i sur. (2019) su u svom istraživanju proveli mikrovalnu ekstrakciju proteina iz uzoraka srebrne pokožice kave pri snazi mikrovalova od 434,7 W. Pri trajanju ekstrakcije od 10 minuta najveći izmjereni udio proteina bio je $43,53 \pm 1,42$ %. Kod povećanja vremena ekstrakcije na 20 minuta maksimalni izmjereni rezultat bio je niži ($39,95 \pm 1,89$ %). Mogući razlog tome je da se produljenjem trajanja ekstrakcije, ekstrakcijska smjesa više zagrijavala što je dovelo do denaturacije proteina. U našem istraživanju nije se pokazao takav trend, najvjerojatnije zbog kraćeg vremena ekstrakcije unutar kojeg se nije javila značajnija denaturacija proteina, te zbog činjenice da smo povišenje temperature, tijekom tretiranja održavali na maksimalno 40°C . Wen i sur. (2019) su također usporedili izmjereni postotak proteina mikrovalnom ekstrakcijom od 10 minuta ($43,53 \pm 1,42$ %) i postotak proteina izmjeren nakon klasične kiselinско-bazne ekstrakcije od 24 sata ($32,52 \pm 0,82$ %), a iz dobivenih rezultata je vidljivo da djelovanje mikrovalova može značajno skratiti vrijeme ekstrakcije.

4.2.1. Statistička obrada rezultata ekstrakcije ukupnih proteina

Analizom varijanci testira se statistički značaj svakog faktora usporedbom srednje vrijednosti kvadrata sa procjenom eksperimentalne pogreške. Iz tablice 10. vidi se da tri faktora: snaga mikrovalova (A), vrijeme ekstrakcije (B) i faktor njihovog međuodnosa (AB) imaju p-vrijednost $< 0,05$ što znači da ta tri faktora imaju značajan učinak na promjenu udjela ukupnih proteina. To je važno jer pokazuje da prilikom optimiranja procesa i planiranja budućih pokusa u obzir moramo uzeti i snagu mikrovalova i vrijeme ekstrakcije, jer oba faktora značajno utječu na koncentraciju ukupnih proteina u ekstraktu. Vrijednost R-kvadrata iznosi 98,901 %, što znači da 98,901 % varijabilnosti rezultata koncentracije ukupnih proteina možemo objasniti ovako postavljenim eksperimentom.

Tablica 10. Analiza varijanci (ANOVA) za udio ukupnih proteina

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupnjevi slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
A:Snaga	0,0345649	1	0,0345649	158,04	0,0011
B:Vrijeme	0,0139394	1	0,0139394	63,74	0,0041
AA	0,000701876	1	0,000701876	3,21	0,1711
AB	0,00897756	1	0,00897756	41,05	0,0077
BB	0,000862509	1	0,000862509	3,94	0,1412
Ukupna pogreška	0,000656115	3	0,000218705	/	/
Ukupna pogreška (ispravljeno)	0,0597024	8	/	/	/

R-kvadrat = 98,901 %

R-kvadrat (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 97,0694 %

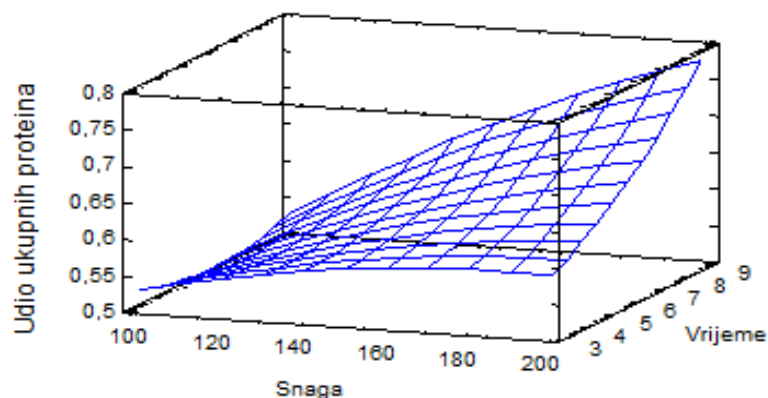
Standardna pogreška, procjena = 0,0147887

Srednja vrijednost apsolutne pogreške = 0,00693025

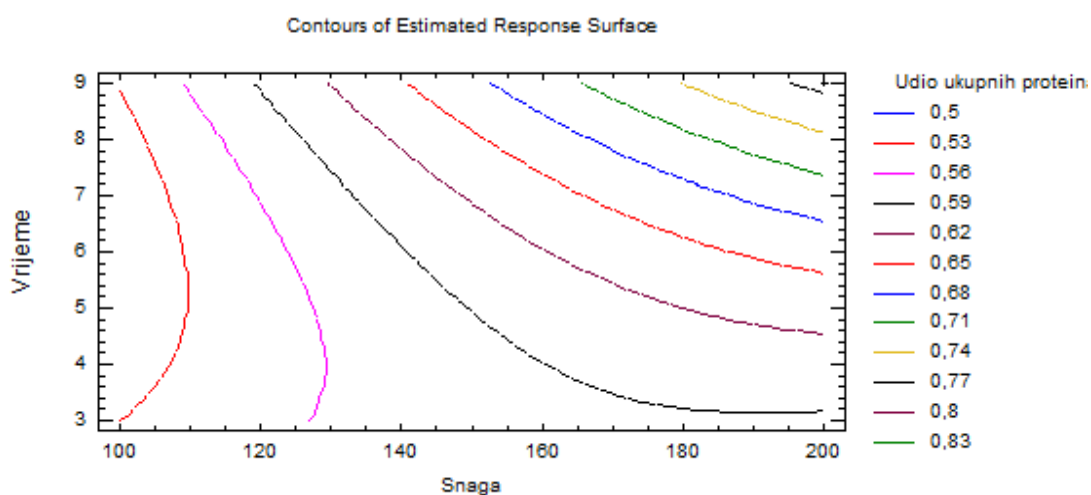
Durbin-Watson statistika = 1,63376 (p=0,1962)

Lag 1 rezidual autokorelacija = 0,162683

Na slikama 15. i 16. prikazani su dijagrami odzivnih površina za koncentraciju ukupnih proteina. Dijagrami daju slikoviti prikaz statističke obrade. Iz oba dijagrama je vidljivo da i snaga mikrovalova i vrijeme ekstrakcije imaju utjecaj na koncentraciju ukupnih proteina. Najviše koncentracije ukupnih proteina postižu se pri najvećoj snazi mikrovalova i najduljem trajanju ekstrakcije. U konturnom dijagramu najveće vrijednosti koncentracije ukupnih proteina nalaze se u gornjem desnom kutu. Ovakvi prikazi odzivnih površina daju nam mogućnost lakšeg planiranja procesa i predviđanja budućih mjerenja, jer su prikazane relativno male promjene koncentracije ukupnih proteina s promjenom snage mikrovalova i vremena ekstrakcije.



Slika 15. Prikaz odzivne površine za koncentraciju ukupnih proteina



Slika 16. Konturni dijagram za odzivne površine za koncentraciju ukupnih proteina

Iz tablice 11. vidljiva je predviđena promjena koncentracije ukupnih proteina s promjenom snage mikrovalova i vremena ekstrakcije. Tablica prikazuje područje vrijednosti u kojoj se javlja najstrmiji uspon krivulje promjene koncentracije ukupnih proteina, odnosno područje u kojem se za najmanju promjenu faktora snage mikrovalova i vremena ekstrakcije najbrže mijenja koncentracija ukupnih proteina. To područje vrijednosti zanimljivo je za istraživanje prilikom potencijalnih budućih mjerenja, ukoliko se želi postići brzo povećanje ili sniženje koncentracije ukupnih proteina.

Jednadžba eksperimentalnog modela omogućuje izračunavanje koncentracije ukupnih proteina s različitim vrijednostima snage mikrovalova i vremena ekstrakcije.

Tablica 11. Predviđena vrijednost koncentracije ukupnih proteina prema postavljenom modelu eksperimenta

		<i>Predviđeno</i>
Snaga (W)	Vrijeme (min)	Koncentracija ukupnih proteina (mg/L)
150,0	6,0	0,604589
151,0	6,03872	0,606737
152,0	6,07869	0,608923
153,0	6,11992	0,611149
154,0	6,16241	0,613416
155,0	6,20617	0,615728

Regresijska jednadžba eksperimentalnog modela koja je prilagođena eksperimentalnim podacima:

$$\text{Koncentracija ukupnih proteina} = 0,479206 + 0,001871 \cdot A - 0,0589972 \cdot B - 0,00000749333 \cdot A^2 + 0,000315833 \cdot A \cdot B + 0,00230741 \cdot B^2,$$

gdje su A-snaga mikrovalova i B-vrijeme ekstrakcije.

Tablica 12. prikazuje rezultate optimizacije parametara ekstrakcije. Optimalna vrijednost koncentracije ukupnih proteina iznosi 0,778097 mg/L, a ona se postiže pri maksimalnoj snazi mikrovalova od 200 W i pri najduljem vremenu ekstrakcije od 9 minuta. Pomoću dobre optimizacije procesa moguće je odrediti koji faktori imaju značajan utjecaj na rezultate i kako postići maksimalne prinose procesa.

Tablica 12. Prikaz rezultata optimizacije

Faktor	Najviše	Najniže	Optimalno
Snaga	100,0	200,0	200,0
Vrijeme	3,0	9,0	9,0
Optimalna vrijednost:		0,778097	

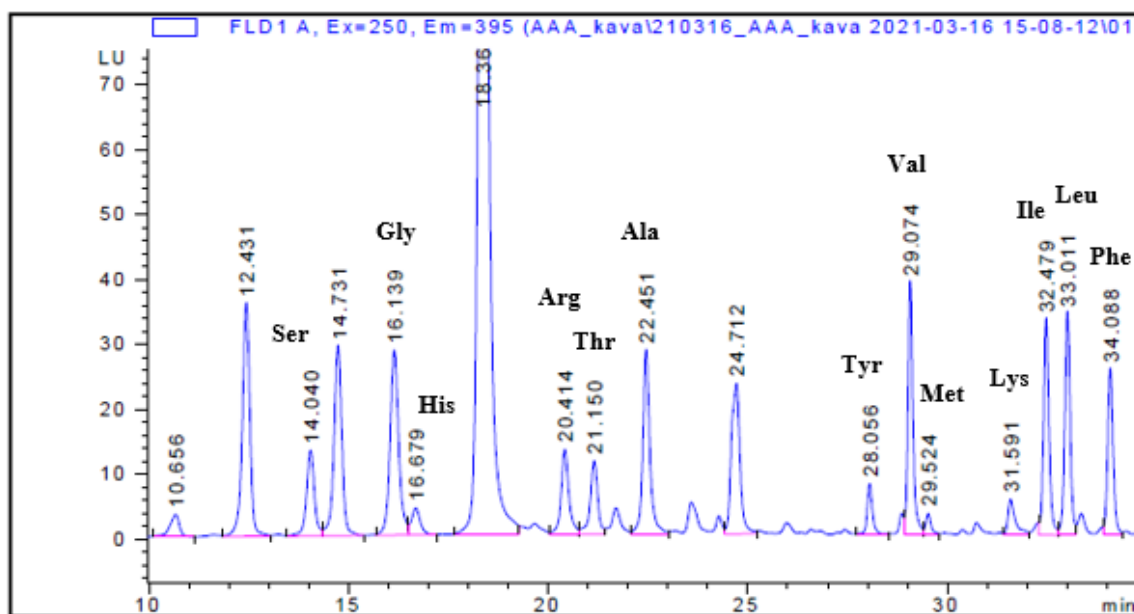
Iz tablice 13. vidljivi su rezultati optimizacije mikrovalne ekstrakcije, optimalne vrijednosti parametara su: snaga 135,74 W i vrijeme 3,0 minute. Optimalna vrijednost ukupnih polifenola je 656,478 mg EGK/100 g, a proteina 0,567496 mg/L. Iako su za optimalni udio ukupnih proteina određeni maksimalni iznosi snage i vremena (200 W i 9 minuta), kada su u obzir uzete i vrijednosti ukupnih polifenola, optimalne vrijednosti parametara su smanjene (135,74 W i 3 minute). Ovakva optimizacija nam omogućuje podešavanje parametara ekstrakcije ovisno o tome kakve prinose pojedinih komponenti želimo postići.

Tablica 13. Rezultati optimizacije mikrovalne ekstrakcije

<i>Faktor</i>	<i>Najviše</i>	<i>Najniže</i>	<i>Optimalno</i>
Snaga	100,0	200,0	135,74
Vrijeme	3,0	9,0	3,0
Optimalna vrijednost:			
Ukupni polifenoli [mg EGK/100 g]			656,478
Ukupni proteini [mg/L]			0,567496

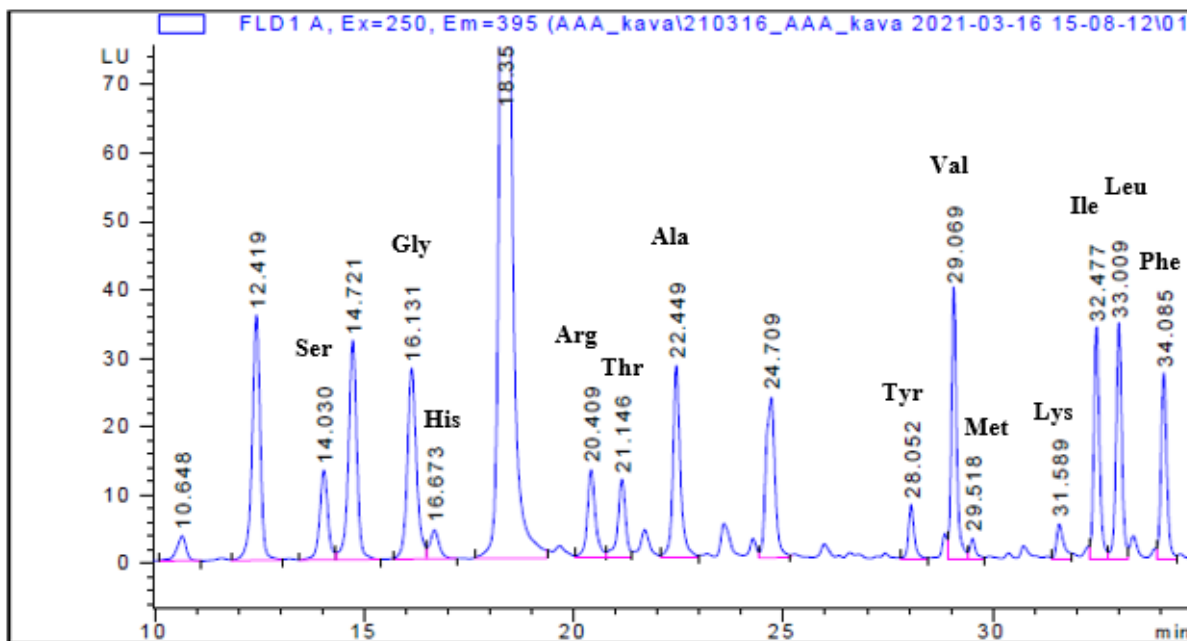
4.3. Rezultati analize aminokiselina

Nakon provedene ekstrakcije proteina i na temelju obrade dobivenih podataka određeni su optimalni rezultati koncentracije ukupnih proteina. Stoga su za analizu aminokiselina odabrani uzorci M2 (9 minuta, 200 W) s najvećom koncentracijom ukupnih proteina i M7 (9 minuta, 150 W) s drugim najvišim rezultatom za ovu koncentraciju.



Slika 17. HPLC kromatogram uzorka M2

*oznake aminokiselina: Ser – serin; Gly – glicin; His – histidin; Arg – arginin; Thr – treonin; Ala – alanin; Tyr – tirozin; Val – valin; Met – metionin; Lys – lizin; Ile- izoleucin; Leu – leucin; Phe - fenilalanin



Slika 18. HPLC kromatogram uzorka M7

*oznake aminokiselina: Ser – serin; Gly – glicin; His – histidin; Arg – arginin; Thr – treonin; Ala – alanin; Tyr – tirozin; Val – valin; Met – metionin; Lys – lizin; Ile- izoleucin; Leu – leucin; Phe - fenilalanin

Iz prikazanih kromatograma (slike 17 i 18) dobivene su koncentracije pojedinih aminokiselina u uzorcima M2 i M7. U tablici 14 su prikazani kvantitativni rezultati analize aminokiselina. Vidljivo je da je najveća koncentracija aminokiselina Asx (539,66 i 533,02 pmol/ μ L) u oba uzorka. Asx označava zajedničku koncentraciju asparaginske kiseline (Asp) i asparagina (Asn), budući da se tijekom kiseline hidrolize proteina Asp konvertira do Asn te se ne mogu individualno kvantificirati. Sljedeća najzastupljenija aminokiselina u oba uzorka je prolin (Pro) sa koncentracijama 485,60 pmol/ μ L u uzorku M2 i 488,52 pmol/ μ L u M7. Treću najvišu koncentraciju ima aminokiselina Glx, koja predstavlja zajedničku koncentraciju glutaminske kiseline (Glu) i glutamina (Gln), kod kojih dolazi do konverzije Glu do Gln. U oba uzorka (M2 i M7) sadržane su gotovo sve esencijalne aminokiseline, koje čine fenilalanin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, treonin, triptofan i valin. Jedina esencijalna aminokiselina koja nedostaje u ovoj analizi je triptofan (Trp), čija se koncentracija ne može odrediti ovom metodom jer tijekom hidrolize dolazi do njegove degradacije. Iz istog razloga ovom metodom je nemoguće odrediti i cistein. Zbog toga što sadrži sve esencijalne aminokiseline, srebrna pokožica kave ima potencijal za korištenje u ljudskoj prehrani.

Tablica 14. Prikaz koncentracija pojedinih aminokiselina u uzorcima M2 i M7

Aminokiselina	RT	M2 [pmol/ μ L]	M7 [pmol/ μ L]
Asx^a	12,45	539,66	533,02
Ser	14,05	155,81	153,29
Glx^a	14,75	403,39	440,91
Gly	16,15	404,64	394,97
His	16,69	36,65	36,94
Arg	20,42	113,05	111,93
Thr	21,17	93,89	96,76
Ala	22,47	212,70	209,15
Pro	24,63	485,60	488,52
Tyr	28,06	47,12	45,78
Val	29,09	116,85	117,78
Met	29,54	13,72	12,46
Lys	31,61	48,32	40,72
Ile	32,50	88,83	90,06
Leu	33,03	93,10	93,81
Phe	34,11	56,99	59,97

^a Tijekom kiselinske hidrolize Asp se konvertira do Asn, a Glu do Gln stoga se ne mogu individualno kvantificirati. Stoga se Asp i Asn određuju zajedno te se označavaju kao Asx, a Glu i Gln kao Glx.

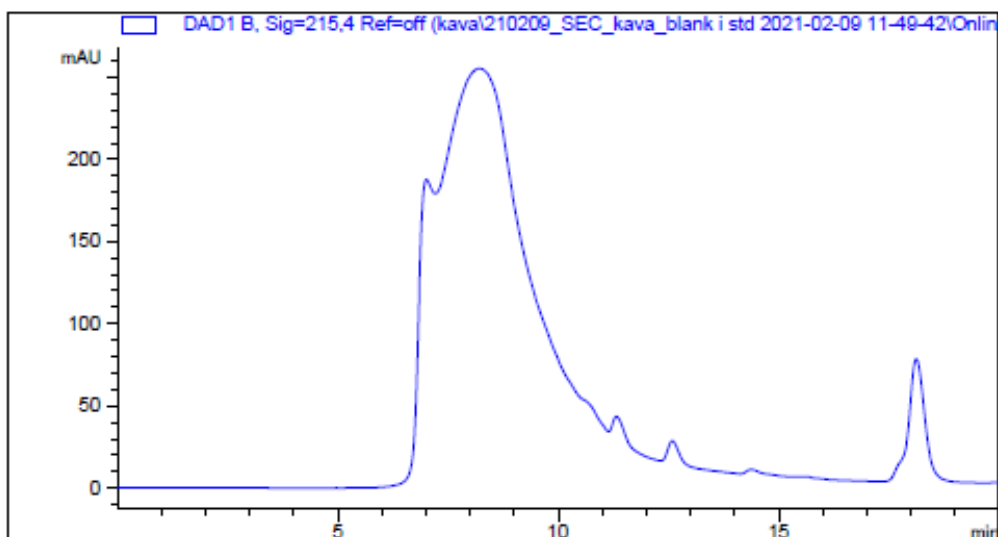
*Tijekom hidrolize dolazi do degradacije triptofana i cisteina, stoga se te aminokiseline ovom metodom ne određuju.

oznake aminokiselina: Ser – serin; Gly – glicin; His – histidin; Arg – arginin; Thr – treonin; Ala – alanin; Tyr – tirozin; Val – valin; Met – metionin; Lys – lizin; Ile- izoleucin; Leu – leucin; Phe – fenilalanin

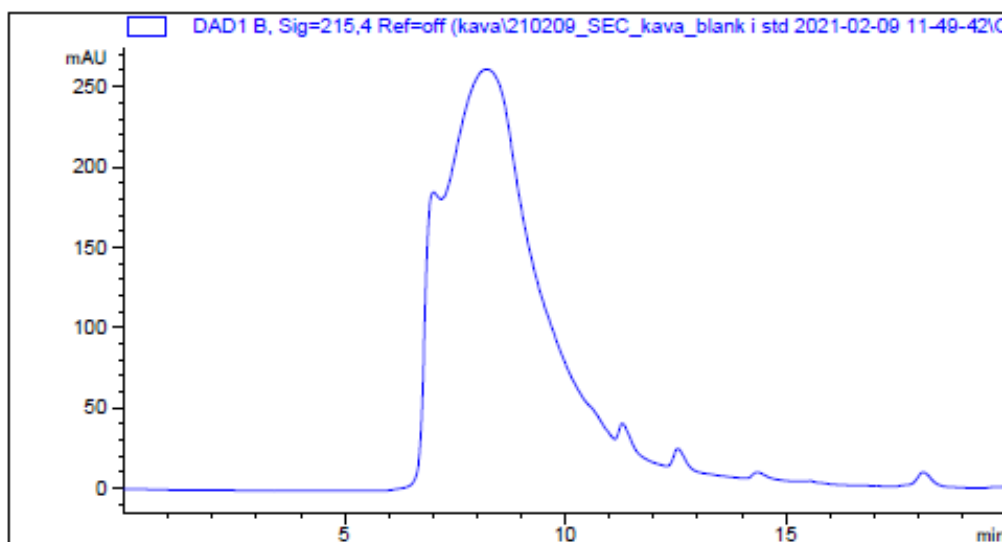
Wen i sur. (2019) su u svom istraživanju također analizirali prisutne aminokiseline iz uzoraka srebrene pokožice kave ekstrahiranih pomoću mikrovalova. U tim uzorcima najzastupljenija aminokiselina bio je glicin ($48,59 \pm 1,01$ %). Druga najzastupljenija je bila asparaginska kiselina, a treća glutaminska kiselina. U uzorcima nisu detektirane sve esencijalne aminokiseline, a prisutnost određenih aminokiselina razlikuje se ovisno o koncentraciji otapala koje je korišteno za ekstrakciju (0,2 M i 0,6 M NaOH).

4.4. Rezultati SEC-HPLC i SDS-PAGE analize

Na slikama 19 i 20 vidljivi su rezultati SEC-HPLC analize. Budući da je SEC-HPLC analiza pokazala nisku razlučivost, ona nije mogla biti korištena kao separacijska tehnika prije spektrometrije masa. Zato je za razdjeljivanje proteina provedena SDS-PAGE.

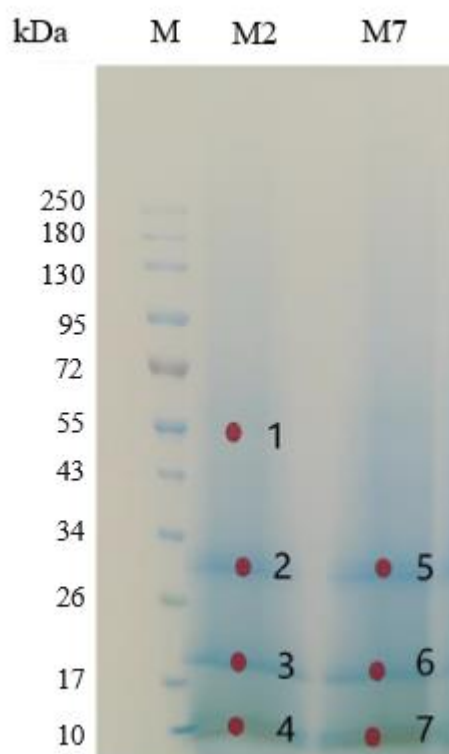


Slika 19. SEC-HPLC kromatogram uzorka M2



Slika 20. SEC-HPLC kromatogram uzorka M7

Rezultati SDS-PAGE analize vidljivi su na gelu na slici 21.



Slika 21. SDS-PAGE gel uzoraka M2 i M7. M-standardi.

Sve proteinske vrpce razdvojene SDS-PAGE metodom (oznake brojevima od 1 do 7; Slika 21) su korištene za analizu spektrometrijom masa. Sa slike je vidljivo da oba analizirana uzorka (M2 i M7) sadrže proteine slične mase. Prilikom SDS-PAGE pokretljivost proteina u gelu ovisi o gustoći naboja (omjer naboja i mase proteina). Što je gustoća naboja proteina veća, to protein brže putuje kroz gel u električnom polju. Kod SDS-PAGE metode natrijev dodecil sulfat se veže na proteine (sulfat) i tako protein ima negativan neto naboj. Tako svi proteini imaju jednaku gustoću naboja, pa njihovo razdvajanje u gelu ovisi samo o njihovoj masi (Simpson, 2006).

Nakon razdvajanja proteina SDS-PAGE metodom i njihove digestije u ovome gelu, provedena je analiza dobivenih peptida MALDI-TOF/TOF metodom. Proteini su identificirani usporedbom dobivenih spektara s onima u bazi podataka UniProt.

Tablica 15. Lista identificiranih proteina u uzorcima

Linija na gelu	Pristupni broj*	MW [kDa]	Vrednovanje pogotka**	Broj ident. peptida	Protein
1	A0A068TV85	48,9	416,1	7	Nekarakteriziran protein
2	A0A068V707	70,2	827,4	12	Nekarakteriziran protein
4	A0A068VGK6	15,7	244,5	6	Sadrži Barwin domenu
5	A0A068V707	70,2	599,5	9	Nekarakteriziran protein
7	A0A068VGK6	15,7	144,2	4	Sadrži Barwin domenu

*Pristupni broj u UniProt bazi podataka

**Vrijednosti iznad 35 se smatraju statistički značajne ($p < 0,05$)

U tablici 15 prikazani su rezultati MALDI-TOF ili TOF/TOF analize, pri čemu je vidljivo da je najveća masa proteina 70,2 kDa, a najniža 15,7. Vrpce proteina izrezane su iz SDS-PAGE gela na mjestima označenima na slici 21. Protein čija je masa 15,7 kDa je karakteriziran kao protein koji sadrži Barwinovu domenu. Ovaj protein s Barwin domenom sadrži 125 aminokiselina i tri disulfidna mosta, koje formiraju oksidirani pobočni lanci cisteina. Njegova biološka uloga u biljkama još nije poznata i u potpunosti istražena, ali bi zbog vezanja oligosaharida mogao biti potencijalni biljni lektin (Svensson i sur., 1992).

Wen i sur. (2019) su određivali molekulsku masu proteina ekstrahiranih iz srebrne pokožice kave klasičnom ekstrakcijom i dobili su proteine molekulske mase od 4,99 do 6,89 kDa. Pri SEC-HPLC analizi kao rezultat je dobiven značajan pik proteina velike molekulske mase (između 375 kDa i 520 kDa) kada su analizirani uzorci tretirani mikrovalovima i ultrazvukom. Takav značajan pik je detektiran i kod klasično ekstrahiranih uzoraka s 24-satnom ekstrakcijom, ali ne i u uzorku koji je ekstrahiran 10 minuta klasičnom ekstrakcijom. U uzorcima su također detektirani i pikovi u rasponu molekulskih masa od 8,8 kDa do 1,8 kDa te neki peptidi s masom manjom od 1 kDa. U njihovom radu, pri usporedbi uzoraka ekstrahiranih klasičnom kiselinsko-baznom ekstrakcijom i uzoraka ekstrahiranih pomoću mikrovalova dobiveni su slični rezultati, odnosno identificirani su proteini i peptidi sličnih molekulskih masa.

5. ZAKLJUČCI

Nakon provedenog eksperimentalnog dijela rada, na temelju dobivenih i statistički obrađenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Uspješno je provedena mikrovalna ekstrakcija polifenola i proteina iz uzoraka srebrne pokožice kave.
2. Iz dobivenih rezultata utvrđen je najveći prinos ukupnih fenola ekstrahiranih iz srebrne pokožice kave upotrebom mikrovalova od $677,8111 \pm 0,03$ mg EGK/100 g, a postignut je tretmanom mikrovalovima snage 150 W kroz 6 minuta. Najveća koncentracija ukupnih proteina u ekstraktu postignuta je snagom mikrovalova od 200W pri ekstrakciji kroz 9 minuta, a iznosila je $0,7734 \pm 0,07$ mg/L.
3. Statistička obrada eksperimentalnih podataka dovela je do zaključka da za ekstrakciju polifenola ni jedan od ispitanih parametara (snaga mikrovalova i vrijeme ekstrakcije) ne pokazuju statističku značajnost ($p > 0,05$). Kod ekstrakcije proteina statistički su značajni i vrijeme trajanja ekstrakcije i snaga mikrovalova te njihov međudodnos.
4. Optimizacijom ekstrakcije ukupnih polifenola dobiveni su optimalni uvjeti za ekstrakciju polifenola – snaga mikrovalova od 135,74 W i trajanje ekstrakcije od 3,0 minute s optimalnim udjelom ukupnih polifenola od 656,478 mg EGK/100 g. Kod ekstrakcije proteina optimalna koncentracija od 0,778097 mg/L postiže se pri ovim uvjetima - snaga mikrovalova od 200 W i trajanje ekstrakcije od 9 minuta. Optimizacijom obiju ekstrakcija - polifenola i proteina, dobiveni su ovi parametri: snaga mikrovalova od 135,74 W i trajanje ekstrakcije od 3,0 minute, pri čemu su udio polifenola i koncentracija proteina, redom, 656,478 mg EGK/100 g i 0,567496 mg/L.
5. Analiza aminokiselina ekstrahiranih proteina pokazala je da su najzastupljenije aminokiseline u ovim uzorcima: asparaginska kiselina (Asp), asparagin (Asn), glutaminska kiselina (Glu), glutamin (Gln), prolin (Pro) i glicin (Gly). Ovdje je važno istaknuti da su u uzorcima prisutne gotovo sve esencijalne aminokiseline.
6. Molekulska masa najzastupljenijih ekstrahiranih proteina procijenjena je SDS-PAGE metodom i iznosila je između 15,7 i 70,2 kDa. Protein molekulske mase od 15,7 kDa sadrži Barwinovu domenu.
7. Srebrna pokožica kave ima izuzetan potencijal kao izvor nutritivno važnih komponenti za proizvodnju funkcionalne hrane, čime se potiče iskorištavanje ovoga nusproizvoda i razvoj održivije proizvodnje kave.

6. LITERATURA

- Ajila CM, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Godbout S, Valéro JR (2011) Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Crit. Rev. Biotechnol.* **31**(3), 227-249. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513677>
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, i sur. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* **117**, 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Ballesteros LF, Teixeira JA, Mussatto SI (2014) Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food Bioprocess Technol* **7**, 3493–3503. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1349-z>
- Bessada SMF, Alves RC, Oliveira MBPP (2018) Coffee silverskin: A review on potential cosmetic applications. *Cosmetics* **5** (1), 5. <https://doi.org/10.3390/cosmetics5010005>
- Chan CH, Yusoff R, Ngoh GC, Kung FWL (2011) Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *J. Chromatogr. A* **1218** (37), 6213-6225. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.040>
- Descroix F, Snoeck J (2008) Environmental Factors Suitable for Coffee Cultivation. 1.izd., Wiley-VCH, Weinheim 164–177.
- EC (2019) European Consilium. <https://www.consilium.europa.eu/hr/policies/green-deal/> Pristupljeno 14. prosinca 2021.
- EESC (2015) European Economics and Social Committee. <https://www.eesc.europa.eu/hr/policies/policy-areas/sustainable-development> Pristupljeno 17. prosinca 2021.
- Farah A (2019) Coffee: Production, Quality and Chemistry. 1.izd., *R Soc Chem*, Rio de Janeiro 1–880.

- Fisher Scientific (2019) https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0014610_WedgeWellTris-GlycineMiniGels_QR.pdf
Pristupljeno 28. siječnja 2022.
- Gavranić M (2015) Mikrovalna ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kože grožđa (diplomski rad), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
- Hardman WE (2014) Diet components can suppress inflammation and reduce cancer risk. *Nutr. Res. Pract.* **8** (3), 233-240. <https://doi.org/10.4162/ntp.2014.8.3.233>
- Janissen B, Huynh T (2018) Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. *Resour. Conserv. Recycl.* **128**, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.10.001>
- Kaderides K, Papaoikonomou L, Serafim M, Goula AM (2019) Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. *Chem Eng Process - Process Intensif* **137**, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.01.006>
- Karlson P (1993) Biokemija za studente kemije i medicine. 7.izd., (preveli Mildner, P., Mildner,B.), Školska knjiga, Zagreb, str. 20-45.
- Krishnan S (2017) Sustainable Coffee Production. *Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science* <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780199389414.013.224>
- Lewin B, Giovannucci D, Varangis P (2011) Coffee Markets: New Paradigms in Global Supply and Demand. *SSRN Electron J.* <https://doi.org/10.2139/ssrn.996111>
- Mandal V, Mohan Y, Hemalatha S (2007) Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacogn Rev* **1** (1), 7-18.
- Mussatto SI (2015) Coffee in Health and Disease Prevention, 1.izd., Academic Press, London
- Mussatto SI, Machado EMS, Martins S, Teixeira JA (2011) Production, Composition, and

- Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food Bioprocess Technol.* **4**, 661–672. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0565-z>
- Narita Y, Inouye K (2014) Review on utilization and composition of coffee silverskin. *Food Res. Int.* **61**, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.023>
- Orsat V, Raghavan GSV, Krishnaswamy K (2017) *The Microwave Processing of Foods*, 2.izd., Woodhead publishing, Cambridge
- Pavlović DM, Ašperger D, Tolić D, Babić S (2013) Development and optimization of the determination of pharmaceuticals in water samples by SPE and HPLC with diode-array detection. *J Sep Sci* **36**. <https://doi.org/10.1002/jssc.201300486>
- Pourfarzad A, Mahdavian-Mehr H, Sedaghat N (2013) Coffee silverskin as a source of dietary fiber in bread-making: Optimization of chemical treatment using response surface methodology. *LWT - Food Sci Technol* **50**. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.001>
- Prandi B, Ferri M, Monari S, Zurlini C, Cigognini I, Verstringe S, i sur. (2021) Extraction and chemical characterization of functional phenols and proteins from coffee (*Coffea arabica*) by-products. *Biomolecules* **11**. <https://doi.org/10.3390/biom11111571>
- Puligundla P (2013) Potentials of Microwave Heating Technology for Select Food Processing Applications - a Brief Overview and Update. *J Food Process Technol* **4**. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000278>
- Rodrigues F, Palmeira-de-Oliveira A, Das Neves J, Sarmento B, Amaral MH, Oliveira MBPP (2015) Coffee silverskin: A possible valuable cosmetic ingredient. *Pharm Biol* **53**, 386–394. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.922589>
- Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**(1), 215–217. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.2155>
- Shortle E, O’Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in

- bovine muscle homogenates. *Meat Sci* **98**. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>
- Simpson RJ (2006) SDS-PAGE of Proteins. *Cold Spring Harb Protoc* **2006**, <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4313>
- Šimunac D (2004) Knjiga o kavi, 1.izd., Grafem, Zagreb
- Shevchenko i sur., (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 850-858. doi:10.1021/ac950914h.
- Skin S, Klingel T, Kremer JI, Gottstein V, Rezende TR De (2020) foods A Review of Coffee By-Products Including leaf, flower, cherry, husk, silver skin and spent grounds as novel foods within the European Union. *Foods* **9** (5), 665. <https://doi.org/10.3390/foods9050665>
- Svensson B, Svendsen IB, Hoejrup P, Roepstroff P, Ludvigsen S, Poulsen Flemming M (1992) Primary structure of barwin: a barley seed protein closely related to the C-terminal domain of proteins encoded by wound-induced plant genes. *Biochemistry*, 31 (37), 8767-8770. doi:10.1021/bi00152a012
- Vinatoru M, Mason TJ, Calinescu I (2017) Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **97**, 159-178. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>
- Vincent J-C (1987) Green Coffee Processing. U: Clarke RJ, Macrae R. (ured.) Coffee, 1.izd., Springer, Dordrecht, str.1–33. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-3417-7-1>
- Wen L (2019) Development of green extraction technologies for the extraction of biomolecules from coffee silverskin (doctoral thesis), School of Biosystems and Food Engineering, University College Dublin, Dublin
- Wen L, Zhang Z, Rai D, Sun DW, Tiwari BK (2019) Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from coffee silverskin: Impact on phenolic content, antioxidant activity, and morphological characteristics. *J Food Process Eng* **42**. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13191>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis