

Primjena RuBisCO proteina u prehrambenoj industriji

Zanini, Irena

Undergraduate thesis / Završni 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:230534>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

Irena Zanini
7788/PT

PRIMJENA RuBisCO PROTEINA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:

PRIMA H2020 GA2032, FunTomP—Functionalized Tomato Products

Mentor: prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Zagreb, 2022.

Ovaj rad financiran je sredstvima projekta PRIMA H2020 GA2032, FunTomP—Functionalized Tomato Products (<https://funtomp.com/>). FunTomP je multidisciplinarni projekt koji uključuje 16 zemalja, a koji ima za cilj preformulirati tradicionalne mediteranske proizvode od rajčice, u različite funkcionalne namirnice koristeći proteine lista (nusproizvodi prerade šećerne repe) i maslina u prahu. U projektu se koriste i nove, te ekološki prihvatljive tehnologije prerade koje će minimalno utjecati na hranjive tvari, s dodatnim zdravstvenim prednostima uz održavanje održivog ciklusa proizvoda i procesa te valoriziranjem poljoprivrednog otpada.

This work was financed by the ongoing project PRIMA H2020 GA2032, FunTomP—Functionalized Tomato Products (<https://funtomp.com/>), a multidisciplinary project involving 16 countries, that aims to reformulate traditional Mediterranean tomato products into different functional foods using leaf proteins (by-products of sugar beet processing) and olive powder and novel and eco-friendly processing technologies that will minimally affect nutrients, with extra health benefits while keeping a sustainable product and process cycle and by valorising agricultural waste.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za opće programe
Laboratorij za održivi razvoj**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

Primjena RuBisCO proteina u prehrambenoj industriji

Irena Zanini, 7788/PT

Sažetak:

Zbog povećanja broja stanovnika na Zemlji povećane su potrebe za proizvodnjom hrane, a time se povećava i otpad poljoprivredne i prehrambene industrije. Zbog toga se prehrambena industrija okreće održivom razvoju i proizvodnji, a jedan od načina je iskorištavanje nusproizvoda poljoprivredne industrije. Jedan od takvih nusproizvoda je lišće šećerne repe. Lišće šećerne repe bogato je proteinima, najviše enzimom ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza-oksigenazom. RuBisCO ima visoku nutritivnu vrijednost, dobar sastav esencijalnih aminokiselina i dobru probavljivost. Zbog dobrih fizikalno-kemijskih i funkcionalnih svojstava (topljivost, pjenjenje, geliranje, emulgiranje) mogao bi se koristiti kao funkcionalni sastojak u širokom rasponu proizvoda i zamijeniti ili djelomično zamijeniti proteine s lošijim svojstvima. Još jedna potencijalna primjena RuBisCO-a bila bi u industriji pakiranja hrane.

Ključne riječi: RuBisCO, lišće šećerne repe, funkcionalna svojstva, pakiranje hrane, održivi razvoj

Rad sadrži: 22 stranice, 5 slika, 1 tablicu, 43 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Pomoć pri izradi:

Datum obrane:

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of General Programmes
Laboratory for sustainable development

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Application of RuBisCO protein in food industry

Irena Zanini, 7788/PT

Abstract:

Due to the population increase on Earth, the needs for food production have increased, and thus the waste of the agricultural and food industry is increasing. For this reason, the food industry is turning to sustainable development and production, and one way is to exploit the by-products of the agricultural industry. One such by-product is sugar beet leaves. Sugar beet leaves are rich in proteins, mostly with enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. RuBisCO has high nutritional value, good composition of essential amino acids and good digestibility. Due to its good physiochemical and functional properties (e.g. solubility, foaming, gelling, emulsifying) it could be used as a functional ingredient in a wide range of product and replace or partially replace proteins with poorer properties. Another potential application of RuBisCO would be in the food packaging industry.

Keywords: RuBisCO, sugar beet leaves, functional properties, food packaging, sustainable development

Thesis contains: 22 pages, 5 figures, 1 table, 43 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Anet Režek Jambrak, PhD Full Professor

Technical support and assistance:

Thesis defended:

Sadržaj

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO.....	2
2.1..ODRŽIVOST I BILJNI PROTEINI	2
2.2..ŠEĆERNA REPA	3
2.2.1.LIST ŠEĆERNE REPE	4
2.3..RuBisCO	4
2.3.1. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA.....	6
2.4..PROTEINI U HRANI.....	7
2.4.1. FUNKCIONALNA SVOJSTVA	8
2.4.1.1. TOPLJIVOST.....	8
2.4.1.2. VEZANJE VODE I MASTI	8
2.4.1.3. PJENJENJE	9
2.4.1.4. EMULGIRANJE	10
2.4.1.5. GELIRANJE	10
2.4.2. NUTRITIVNA VRIJEDNOST	11
2.4.3. PRIMJENA RuBisCO-A U HRANI.....	12
2.5..AMBALAŽA	13
2.5.1. ELEKTROPREDENJE	14
2.5.2. BIOFILMOVI.....	15
3.ZAKLJUČCI.....	17
4.POPIS LITERATURE	18

1. UVOD

Zbog stalnog porasta broja stanovnika, povećava se potražnja za jeftinijim i održivijim izvorima kao što su biljni proteini za nadopunu ili zamjenu za skupe i ograničene izvore proteina iz mesa (Hadidi, 2019).

Lišće različitih vrsta biljaka dugo se smatralo izvorom proteina za primjenu u ljudskoj prehrani i ishrani životinja zbog njihove velike rasprostranjenosti u prirodi, nutritivne vrijednosti i dobrih funkcionalnih svojstava (Kiskini i sur., 2016).

Do danas se najviše pažnje davalo proteinima iz sjemena ili biljaka poput soje, graška i proteinima iz nusproizvoda uljarske industrije (suncokret, repica). U zadnje vrijeme sve zanimljiviji postaju proteini iz lišća zelenih biljaka, npr. iz špinata, amla i trave. Još jedan od važnih izvora proteina su listovi šećerne repe, koji su nusproizvod industrije šećera. Korištenje nusproizvoda ima potencijalnu ekonomsku korist i doprinosi ostvarivanju ciljeva održivog razvoja.

Lišće zelenih biljaka bogato je proteinima, od kojih je najbogatije enzimom ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza-oksigenazom.

Enzim RuBisCO, najrasprostranjeniji je protein u biosferi i čini većinu proteina lišća zelenih biljaka. Atraktivan je za konzumaciju ljudi zbog svojih funkcionalnih svojstava (pjenjenje, stvaranje emulzija i gelova), nutritivne vrijednosti (bogat izvor esencijalnih aminokiselina) i probavljivosti pa se sve više proučava za primjenu u prehrambenoj industriji.

Zbog ekoloških problema koji dolaze s plastičnom ambalažom jer se ne može lako razgraditi, počinju se istraživati novi materijali dobiveni iz obnovljivih izvora. Novim materijalima mogu se proizvesti biorazgradiva, jestiva i pametna pakiranja. To mogu biti nanovlakna dobivena tehnikom elektropredenja ili biofilmovi. Kao materijali mogu se primjenjivati proteini, pa bi tako i RuBisCO mogao naći primjenu u industriji pakiranja.

Cilj ovog rada je opisati kako se proteini, točnije RuBisCO iz zelenog lišća šećerne repe, mogu iskoristiti kao izvor hrane i kako bi se mogli primijeniti u pakiranju hrane. Također je opisana aktivnost RuBisCO-a, njegova funkcionalna svojstva koja su važna za primjenu u sustavima hrane.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ODRŽIVOST I BILJNI PROTEINI

Održivi razvoj je način proizvodnje i potrošnje koji vodi računa o prirodnim resursima ekosustava unutar kojeg se ti procesi događaju. Oslanja se na ideju prema kojoj razvoj ne smije ugrožavati budućnost nadolazećih naraštaja trošenjem neobnovljivih izvora i dugoročnim devastiranjem i zagađivanjem okoliša. Cilj održivog razvoja je trojak – teži gospodarskom razvoju, socijalnom napretku i zaštiti okoliša (slika 1) (ODRAZ, 2022).



Slika 1. Tri sastavnice održivog razvoja (LORA, 2019)

Trenutni prehrambeni sustav nije održiv (Aiking i de Boer, 2020). Proizvodnja hrane koristi neodržive količine prirodnih resursa kao što su zemljište, voda, energija sa štetnim utjecajem na ekologiju, gospodarstvo i društvo. Također dovodi do onečišćenja (emisije reaktivnih dušikovih spojeva, staklenički plinovi, pesticidi, antibiotici) s neodrživim utjecajem na biološku raznolikost i ljudsko zdravlje.

Jedna od opcija da bi zapadnjačka prehrana bila održivija je da bi se konzumacija životinjskih proteina trebala smanjiti, a povećati konzumacija proteina iz biljnih izvora (Aiking i de Boer, 2020).

Najčešće biljke bogate proteinima su soja, mahunarke i uljarice. Biljni proteini vitalna su komponenta stočne hrane jer su dobar izvor aminokiselina. Osim toga, sve se više konzumiraju kao ljudska hrana s godišnjom stopom rasta od gotovo 7 % na globalnoj razini. Osim

ekonomske koristi za poljoprivrednike i proizvođače hrane i stočne hrane, razvoj proizvodnje biljnih proteina donosi i niz prednosti za okoliš. Posebno, proteinske kulture pridonose fiksiranju dušika iz atmosfere u tlo i stoga igraju važnu ulogu u održivijem ciklusu nutrijenata (*European Commission* 2022).

Zamjene za meso i mliječne proizvode na bazi biljnih proteina mogu pružiti jednaku kvalitetu uz niže troškove i uz ispunjavanje svjetskog prioriteta smanjenja emisije stakleničkih plinova i ograničavanja uništenja šumskog zemljišta (Day, 2013).

Skunca i sur. (2021) objavili u rad u kojem su procjenjivali ekološki utjecaj sistema ekstrakcije i izolacije RuBisCO-a iz listova šećerne repe. Proračuni procjene životnog ciklusa su se napravili kako bi se identificirao i kvantificirao ekološki utjecaj iz perspektive od koljevke do koljevke (eng. *cradle to cradle*). Kada se uspoređi ekstrakcija RuBisCO-a iz listova šećerne repe s drugim materijalima, jedina kultura koja ima manji utjecaj na okoliš je amla, dok veći utjecaj imaju žuta gorušica, ljulj, talijanski ljulj, prokulice, engleski ljulj, listovi mrkve, listovi rotkvice i cikorija. Uspoređujući izolat RuBisCO-a s izolatima drugih proteina, RuBisCO ima manji utjecaj na okoliš od proteina jajeta, a veći od proteina soje.

2.2. ŠEĆERNA REPA

Šećerna repa (lat. *Beta vulgaris* var. *altissima*) dvogodišnja je biljka iz porodice laboda (*Chaenopodiaceae*). U prvoj godini vegetacije stvara zadebljali korijen i ružicu listova, a u drugoj cvatnu stabljiku, cvijet i sjeme. Prvenstveno se uzgaja zbog zadebljalog korijena koji sadrži od 14 do 20 % šećera (saharoze). U proizvodnji šećerne repe veliki značaj imaju i nusproizvodi kao što su lišće s glavama, repini rezanci, melasa i saturacijski mulj. Repino lišće s glavama služi za stočnu hranu ili se ostavlja na polju kao organska masa za gnojenje (Anonymous 1, 2022).



Slika 2. Lišće šećerne repe (Anonymous 2)

2.2.1. List šećerne repe

Lišće šećerne repe (slika 2) sporedni je tok uzgoja šećerne repe. Trenutno se listovi šećerne repe ostavljaju na tlu pa mnogi potencijalno vrijednih spojeva kao što su proteini ostaju neiskorišteni (Kiskini, 2017). Šećerna je repa jedan važan izvor lišća širom svijeta i među deset je usjeva koji se najviše proizvode u nekoliko zemalja (Belgija, Nizozemska, Njemačka, Francuska, itd.). Lišće čini 20-34 % biljke, a prosječno sadrže 22,8 % sirovih proteina u suhoj tvari. Ova je vrijednost prilično usporediva s proizvodnjom proteina iz soje i žitarica.

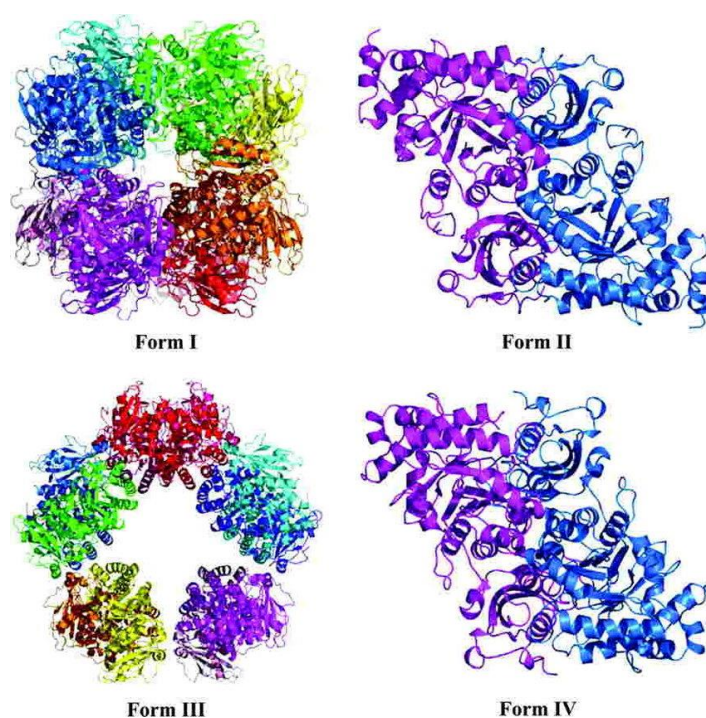
Većina proteina u lišću nalazi se u kloroplastima. Proteini u lišću sastoje se od topljivih i netopljivih proteina. RuBisCO čini i do 50 % topljive frakcije, a u netopljivoj frakciji su membranski proteini koji su vezani s klorofilom, karotenoidima i mastima (Tenorio, 2017).

Starost šećerne repe ne utječe na sadržaj proteina u cijelom lišću, ali znatno utječe na boju, odnosno kvalitetu proteinskog ekstrakta. Proteini ekstrahirani iz lišća starijih biljaka su smeđi, a iz lišća mlađih biljaka žuti. Smeđa boja ekstrakta iz lišća starijih biljaka je zbog formiranja kinona koji nastaju oksidacijom fenolnih spojeva uz enzim polifenol oksidazu (Kiskini i sur., 2016).

2.3. RuBisCO

Rubuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza, skraćeno RuBisCO, enzim je prisutan u svim višim biljkama, a također i u cijanobakterijama, fitoplanktonu i algama. U zelenim biljkama, RuBisCO je najzastupljeniji protein, koji čini i do 50 % topljivih proteina u listu, što ga čini jednim od najzastupljenijih proteina u biosferi (Nynäs, 2018).

Jedan je od najvećih enzima u prirodi, Molekulska masa mu je 560 kDa. Sastoji se od velike i male podjedinice (Spreitzer i Salvucci, 2002). Trodimenzionalna struktura RuBisCO-a je kompaktna i čvrsto presavijena, tipična za globularne proteine (Barbeau i Kinsella, 1988). RuBisCO se može naći u više forma, ovisno u kojim se stanicama nalazi (slika 3). Forma I holoenzima najčešća je forma RuBisCO-a i pronađena je u kopnenim biljkama i zelenim algama. Takvi enzimi imaju heksadekameričku strukturu koja se sastoji od osam velikih i osam malih podjedinica. Sastav i slijed aminokiselina velikih podjedinica iz različitih biljaka je sličan, dok postoje značajne razlike u malim podjedinicama. Forma II RuBisCO-a su dimeri, posjeduju dvije velike podjedinice i nemaju male podjedinice, a mogu se naći u nekim prokariotima i dinoflagelatima. RuBisCO u arheobakterijama sastoji se od dekamera s pet velikih podjedinica koje formiraju dimere (Udenigwe i sur., 2017).



Slika 3. Strukture različitih formi enzima RuBisCO (Tabita i sur., 2018)

Izoelektrična točka RuBisCO-a iznosi 4,6-5,5, ovisno o vrsti (Martin i sur., 2019). RuBisCO je blago kiseo i nosi negativan naboj pri neutralnom pH za špinat, amla i duhan i ima tendenciju vezivanja kationa. To je zbog omjera aspartata i glutamata prema histidinu, argininu i lizinu. Također je hidrofoban (Barbeau i Kinsella, 1988).

RuBisCO je bifunkcionalan enzim i sudjeluje u reakcijama fiksacije ugljikovog dioksida i fotorespiracije (vezivanje kisika). Njegova primarna uloga je pretvaranje CO₂ iz atmosfere u

organske spojeve koji se koriste u reakcijama Calvinova ciklusa. Odgovoran je za neto fiksaciju od 10^{11} tona CO_2 iz atmosfere u biosferu godišnje (O'Donnelly i sur., 2014). U reakcijama karboksilacije iz rubuloza-1,5-bisfosfata nastaju dvije molekule 3-fosfoglicerata, a u reakcijama oksigenacije nastaju jedna molekula 3-fosfoglicerata i jedna molekula fosfoglikolata (Udenigwe i sur., 2017, Barbeau i Kinsella, 1988).

Ima vrlo sporu brzinu katalize, može fiksirati samo 3-10 molekula CO_2 u sekundi, mali afinitet prema atmosferskom ugljikovom dioksidu i koristi kisik kao alternativni supstrat za kompetitivnu reakciju fotorespiracije, zbog čega je najsporiji enzim u prirodi. Posljedično, biljke moraju dodijeliti 50 % svog dušika RuBisCO-u što ga čini najzastupljenijim u svijetu (Vukadinović i sur., 2014, Spreitzer i Salvucci, 2002).

2.3.1. Određivanje aktivnosti enzima

Aktivnost enzima određuje se mjerenjem količine nastalog produkta ili utrošenog supstrata u poznatim uvjetima temperature, pH i koncentracije supstrata. Različitim metodama mogu se detektirati kvantitativne promjene koncentracija supstrata ili produkata enzimskih reakcija. Najčešće se koriste spektrofotometrija, fluorimetrija i luminometrija.

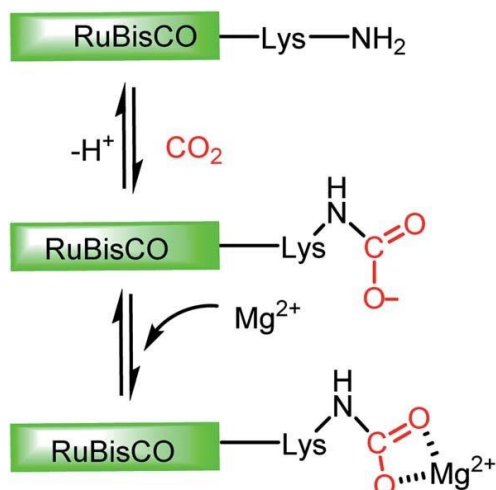
Sve se više razvijaju metode određivanja aktivnosti enzima masenom spektrometrijom. Prednost ovih metoda je što imaju mogućnost provjere i kvantifikacije gotovo svake vrste molekule, supstrati i produkti se mogu lako odijeliti i imaju različite mase.

Radioaktivnost se može koristiti kada se ne može postići specifičnost i/ili osjetljivost konvencionalnim metodama. Ova metoda primjenjuje se za određivanje ugrađivanja CO_2 u reakciji karboksilacije koju katalizira RuBisCO (Rogers i Gibon, 2009).

Maksimalna aktivnost karboksilacije RuBisCO-a *in vitro* može se odrediti unosom CO_2 i mjerenjem radioaktivne aktivnosti kiselinsko stabilnih produkata. Druga metoda koja se koristi je kontinuirana i koristi NADH-vezani enzimski sustav i spektrofotometar. Ove metode korisne su za određivanje aktivnosti RuBisCO-a u poljoprivrednim i divljim vrstama biljaka. Kubien i sur. (2011) detaljno su opisali navedene metode.

Za aktivaciju RuBisCO-a potrebni su bikarbonatni ion HCO_3^- i magnezijev ion Mg^{2+} . Gradijent pH u kloroplastu čini stromu više alkalnom, što pomiče ravnotežu od CO_2 na HCO_3^- . Bikarbonatni ion se veže za jedan lizinski ostatak enzima. Magnezijev ion stabilizira karbamilirani enzim. Time se mijenja konformacija RuBisCO-a koji sada može vezati supstrat,

ribulozu-1,5-bisfosfat i CO_2 (slika 4) (Andersson, 2008, Barbeau i Kinsella, 1988).



Slika 4. Aktivacija RuBisCO-a (Sreejyothi i Mandal, 2020)

Seemann i sur. (1983) određivali su *in vitro* aktivnost RuBisCO-a u različitim vrstama biljaka. Prosječna specifična brzina enzimske aktivnosti za C₃ vrste, među koje spada i šećerna repa, iznosila je 3,1 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ RuBisCO, a broj obrtaja, k_{cat} , 29 mol $\text{CO}_2 \text{mol}^{-1}$ RuBisCO s⁻¹, dok je afinitet enzima prema supstratu K_m (CO_2) iznosio 12-26 $\mu\text{M CO}_2$.

2.4. PROTEINI U HRANI

Proteini su makromolekule koje se sastoje od linearnih polimera aminokiselinskih ostataka koji su povezani peptidnim vezama. Imaju različita strukturna, funkcionalna i nutritivna svojstva koja su korisna za prehrambenu industriju u formulaciji hrane.

Fizikalno-kemijska svojstva proteina kao što su hidrofobnost površine, neto naboj i prisutnost reaktivnih grupa ovise o vrsti, broju, redoslijedu, orijentaciji aminokiselina i interakcijama između njih. Veličina molekule, oblik proteina i procesni parametri utječu na funkcionalna svojstva kao što su geliranje, topljivost, termalna stabilnost, emulgiranje, pjenjenje. Funkcionalna svojstva utječu na interakcije proteina s drugim makro i mikromolekulama, izolaciju, degradaciju, procesiranje i skladištenje (Sim i sur., 2021).

Proteini se u hrani koriste zbog dva glavna razloga, prvi je zbog njihove nutritivne vrijednosti, a drugi zbog funkcionalnih svojstava. Nutritivna vrijednost određena je primarnom strukturom i probavljivošću proteina. Funkcionalnost proteina može se podijeliti na topljivost, pjenjenje, emulgiranje i geliranje (de Jong i Nieuwland, 2011). Prema tome proteini se u sustavima hrane

mogu koristiti za geliranje, emulgiranje i kao stabilizatori pjena (Nynäs, 2018).

Proteini iz lišća, točnije RuBisCO, predloženi su kao potencijalan izvor proteina za konzumaciju ljudi već 1940-ih (Nynäs, 2018). RuBisCO visoke čistoće bijeli je prah bez okusa i mirisa, a nutritivna vrijednost mu je jednaka ili čak veća od ostalih proteina iz drugih izvora (Barbeau i Kinsella, 1988). Konkurentan je izvor bioaktivnih peptida s opioidnim, antioksidativnim, antihipertenzivnim svojstvima, poboljšava pamćenje i stimulira apetit (Di Stefani i sur., 2018). RuBisCO izoliran iz špinata i amla uglavnom se koristi za proizvodnju bioaktivnih peptida i hidrolizata (Udenigwe i sur., 2017).

2.4.1. Funkcionalna svojstva

Funkcionalna svojstva proteina uvelike su ovisna o topljivosti proteina, čistoći uzorka i vezama s polifenolima i spojevima koji daju loš okus (eng. *off-flavours*) kao što su spojevi sa sumporom. Provedena istraživanja s pročišćenim RuBisCO-m pokazuju da ovaj protein ima obećavajuće funkcije za upotrebu u hrani za ljudsku prehranu (de Jung i Nieuwland, 2011).

2.4.1.1. Topljivost

Topljivost je temeljno funkcionalno svojstvo proteina u većini sustava hrane. Utječe na druga funkcionalna svojstva kao što su vezanje vode i masti, pjenjenje, emulgiranje i geliranje. Faktori koji utječu na topljivost su pH, temperatura, ionska jakost, prisustvo divalentnih kationa i vrsta biljke iz koje je protein izoliran (Di Stefano i sur., 2018).

Pad topljivosti izolata RuBisCO-a u rangu je s izolatima proteina soje, a veći od komercijalnih proteina sirutke kod izoelektrične točke. Matrin i sur. (2019), navode da bi to moglo biti zato što su komercijalni proteini sirutke ekstrahirani iz tekućeg izvora, a izolati RuBisCO-a i proteina soje iz netopljivog izvora biljnog materijala što može dovesti do djelomičnog gubitka nativnog stanja. Pri pH ispod 4,0 i iznad 6,0 topljivost RuBisCO-a je bila najveća, do 80 %. Visokoj topljivosti pridonijeli su način izolacije proteina, odsutnost soli i uklanjanje gotovo svih polifenola (Martin i sur., 2019).

2.4.1.2. Vezanje vode i masti

Svojstvo vezanja vode važno je u mnogim prehrambenim proizvodima jer o tome ovisi tekstura hrane. Proizvod koji ima mali kapacitet vezanja vode bit će suh ili će izgubiti vodu tijekom skladištenja.

Vežanje vode RuBisCO-a je nisko u nativnom stanju. Kapaciteta vežanja vode povećava se denaturacijom proteina.

Vežanje masti važno je svojstvo zbog toga što poboljšava zadržavanje okusa i pretpostavlja se da poboljšava osjećaj u ustima. Ne ovisi o svojstvu vežanja vode.

Apsorpcija masti za RuBisCO veća je nego za izolat proteina soje (de Jung i Nieuwland, 2011).

2.4.1.3. Pjenjenje

Pjene nastaju kada se zrak unese u otopinu koja sadrži aktivne komponente, što dovodi do stvaranja filmom inkapsuliranih mjehurića koji su disperzirani u tekućoj kontinuiranoj fazi. Na početku formiranja pjene mjehurići su uglavnom sferični, ali s vremenom, ako su dovoljno stabilni, mjehurići tvore poliedarske oblike s tankim tekućim lamelama. Slično emulzijama, međupovršina plin/tekućina mora se stabilizirati kako se ne bi rasprsnuli. Stabilnost pjena ovisi o snazi i fleksibilnosti filma na međupovršini plin/tekućina. Povećanjem viskoznosti tekućine brzina drenaže i stanjenje lamele mogu se svesti na minimum, a skupljanje mjehurića može se spriječiti upotrebom površinski aktivnih tvari s dobrim viskoelastičnim svojstvima (Nynäs, 2018).

Proteini mogu biti dobri stabilizatori pjena jer imaju sposobnost adsorpcije na međupovršinu plin/tekućina, steričku stabilizaciju adsorbiranih proteina i strukturnu povezanost formiranog sloja filma. Na ova svojstva utječe sastav aminokiselina i način ekstrakcije i rekuperacije proteina (Nynäs, 2018).

Općenito je uočeno da je stabilnost pjene značajno viša u blizini izoelektrične točke proteina, gdje je neto naboj jednak nuli pa su elektrostatske interakcije minimalne (Di Stefano i sur., 2018).

Pri pH 4,0 i koncentraciji od 50 g kg⁻¹ ili većoj izolat RuBisCO-a pokazuje dobar kapacitet pjenjenja i puno bolje nego komercijalni proteini sirutke i izolati proteina soje, dok pri pH 7,0 pokazuje lošiji kapacitet pjenjenja pri bilo kojoj koncentraciji. U usporedbi s komercijalnom proteinima sirutke i izolatom proteina soje, pokazalo se da RuBisCO ima najbolju stabilnost pjene i na pH 4,0 i na 7,0 (Martin i sur., 2019).

RuBisCO se može koristiti kao zamjena za proteine bjelanjaka. U optimalnim uvjetima daje jednak volumen pjene, ali dužu stabilnosti (de Jong i Nieuwland, 2011).

2.4.1.4. Emulgiranje

Emulzije se dobivaju miješanjem dviju tekućina, koje se ne miješaju, u prisustvu stabilizirajućeg agensa.

Emulgiranje je važno površinski aktivno svojstvo proteina hrane i odnosi se na sposobnost proteina da stvaraju i stabiliziraju emulzije u raznim matricama hrane. Tijekom emulgiranja, stabilizator inkapsulira kapljice ulja i tako omogućava da se kapljice rasprše u kontinuiranoj fazi – vodi. Tvari koje se najčešće koriste kao stabilizatori emulzija u hrani su proteini i polisaharidi (Nynäs, 2018). Hidrofobnost, molekularna fleksibilnost i postupak pročišćavanja utječu na emulgirajuću aktivnost proteina. Svojstva emulgiranja povećavaju se s porastom pH što može biti povezano s odmatanjem proteina i povećanjem međupovršine ulje/voda što se javlja pri alkalnom pH (de Jong i Nieuwland, 2011).

Pokazano je da je emulgirajuća aktivnost RuBisCO-a manja nego kod albumina goveđeg seruma (BSA) i sojinih proteina (Di Stefano i sur., 2018), a slična proteinima bjelanjaka (de Jong i Nieuwland, 2011). Emulzije s izolatom RuBisCO-a pokazale su malu veličinu kapljica ulja, dobru stabilnost i bijeli izgled, koji je usporediv s većinom proteinskih izolata koji se trenutno primjenjuju u hrani (Martin i sur., 2019).

2.4.1.5. Geliranje

Gelovi se formiraju kada polimeri u otopini međusobno djeluju i formiraju mrežu u kojoj je zarobljena tekućina. Često se nazivaju „meke krutine“ jer se ponašaju slično krutinama ili „kruta voda“ zbog visokog udjela vode u odnosu na ostale komponente.

Strukture proteinskih gelova mogu biti podijeljene u dvije grupe: fino lančani gelovi i gelovi u obliku čestica. Proteinska mreža kod finih lančastih gelova uređena je u strukture u nanometarskoj skali, dok je mreža kod gelova u obliku čestica grublja i mjeri se u mikrometarskoj skali. Fino lančasti gelovi uglavnom su prozirni, a gelovi u obliku čestica nisu, ali je veličina agregata relativno jednaka. Struktura gela ovisi o pH, jakosti ionskih veza. Odbojnije veze dat će uređeniju strukturu, a pri pH izoelektrične točke proteina formirat će se gelovi koji će biti manje hidratizirani i manje čvrsti. Sposobnost geliranja ovisi o sastavu aminokiselina, hidrofobnosti, molekulskoj masi i koncentraciji proteina (Nynäs, 2018).

Proteinski izolati iz zelenog lišća poput duhana, aflaafla i lišća šećerne repe pokazuju slična ili bolja svojstva stvaranja gelova nego konvencionalni proteinski izolati kao što su bjelanjak i

proteini soje. RuBisCO ima nisku temperaturu denaturacije i sposobnost brzog stvaranja gelova pri niskim koncentracijama. Prema Martin i sur. (2019) temperatura denaturacije RuBisCO-a iznosi 64,9 °C. Za formiranje gelova od RuBisCO-a odgovorne su nekovalentne interakcije, uglavnom hidrofobne, i vodikove veze. Takvo vezivanje rezultira stvaranjem slabih gelova koji su krhki i podložniji ranijem pucanju. Nedavna istraživanja pokazala su korelaciju između krhkosti i percepcije intenziteta okusa. Krhki gelovi razbijaju se na brojne male fragmente što rezultira većom površinom kontakta između fragmenata i tkiva usne šupljine, a time i veće interakcije spojeva okusa i receptora okusa. Ovo svojstvo posebno vidljivo za gelove koji sadrže šećere i moglo bi biti od koristi za osmišljavanje proizvoda s manjim udjelom šećera (Di Stefano i sur., 2018).

Izolati RuBisCO-a odmah stvaraju gelove tijekom zagrijavanja zbog niske temperature denaturacije u usporedbi s komercijalnim proteinima sirutke i izolatima proteina soje. Kritična koncentracija geliranja mnogo je niža za izolat RuBisCO-a nego za proteine sirutke i soje, a za geliranje je potrebno 50-66 % manje proteina. Pri pH 4,0 i 7,0 RuBisCO se pokazao kao odličan gelirajući agens (Martin i sur., 2019).

Martin i sur. (2014) uspoređivali su gelove od RuBisCO-a iz špinata s drugim proteinima kao što su izolat proteina sirutke, protein bjelanjka i biljni proteini izolati soje, graška i lupine. Došli su do zaključka da RuBisCO tvori gelove jedinstvenih svojstava.

2.4.2. Nutritivna vrijednost

Nutritivna vrijednost proteina ovisi o sastavu i dostupnosti aminokiselina. Dostupnost aminokiselina ovisi o strukturi proteina, ali i o sastavu jela. Nutritivna vrijednost često je manja od očekivane zbog gubitka funkcionalnih svojstava tijekom sušenja i tijekom oksidacije. Također se gubi u prisustvu polifenolnih spojeva jer se vežu na aminokiseline lizin i cistein i time smanjuju probavljivost (de Jong i Nieuwland, 2011).

RuBisCO je atraktivan zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti i *in vitro* probavljivosti. Da bi bio dobro probavljiv moraju se ukloniti antinutritivne komponente kao što su inhibitori proteaze, fitati i polifenolni spojevi. Smatra se dobrim izvorom esencijalnih aminokiselina (Di Stefano i sur., 2018).

Tablica 1. Esencijalne aminokiseline iz prehrambenih izvora i FAO/WHO preporuka za dnevni unos (Barbeau i Kinsella, 1988).

Aminokiselina	FAO/WHO	Cijelo jaje	Kazein	Soja	RuBisCO
(g/16 g N)					
Lizin	5.5	6.4	8.0	6.9	6.5
Triptofan	1.0	1.2	1.3	1.3	2.7
Treonin	4.0	5.0	4.3	4.3	5.3
Cistein + metionin	3.5	5.5	3.5	2.4	3.4
Valin	5.0	7.4	7.4	6.4	6.7
Izoleucin	4.0	6.6	6.6	5.1	4.9
Leucin	7.0	8.8	10.0	7.7	9.4
Tirozin + fenilalanin	6.0	10.1	11.2	8.9	12.8

Tablica 1. prikazuje usporedbu esencijalnih aminokiselina RuBisCO-a s ostalim proteinima s FAO/WHO preporukom za unos u ljudskoj prehrani. RuBisCO ima manje aminokiselina koje sadrže sumpor kao što su metionin i cistein. Također ima manje aminokiselina valin i cistein u usporedbi s proteinima cijelog jajeta i kazeinom. Iako sadržaj lizina nije tako visok u odnosu na kazein i neke proteine iz mahunarki, ima potencijal za nadopunu zrna žitarica kojima manjka lizina.

2.4.3. Primjena RuBisCO-a u hrani

RuBisCO se može primijeniti u širokom spektru proizvoda koji trebaju blage uvjete obrade. Neki od tih proizvoda su zamjene za meso, sastojci za povećavanje volumena i sastojci za povezivanje i agensi za poboljšanje mesa.

Zbog dobrih gelirajućih svojstava mogu se koristiti u proizvodima na bazi krumpirovog škroba i popećcima od ribe (*fish cakes*). Za ove proizvode, RuBisCO bi mogao biti održivija zamjena za proteine soje i bjelanjka (Martin i sur., 2014).

Pjena RuBisCO-a mogla bi se koristiti kao zamjena za pjene na bazi mliječnih proizvoda za primjenu u sladoledima i desertima (Van de Velde i sur., 2011).

Inkorporiranje RuBisCO-a u proizvode na bazi pšenice povećalo bi količinu proteina i poboljšalo profil esencijalnih aminokiselina, posebice lizina.

Ducrocq i suradnici (2020) istraživali su kako obogaćivanje pšeničnog tijesta RuBisCO-m utječe na mehanička svojstva tijesta i protein-protein veze. Također su tijesto obogaćivali glutenom i proteinima graška za usporedbu.

Uspoređujući s proteinima graška i glutenom, RuBisCO je pokazao specifično ponašanje. Ne smanjuje otvrdnjavanje tijesta tijekom zagrijavanja, to jest očuvao je elastični potencijal tijesta zbog njegove reaktivnosti i niske kompeticije sa škrobom za vodu. Detaljne analize pokazale su da RuBisCO postaje dio glutenske mreže koja se formira tijekom miješanja tijesta stvarajući slabe i kovalentne veze. Dodatno, podjedinice RuBisCO-a stvaraju nove kovalentne veze tijekom toplinske obrade. Ovi rezultati pokazuju da RuBisCO aktivno sudjeluje u formiranju proteinske mreže tijesta. Za razliku od toga proteini graška i gluten ne mijenjaju polimerizaciju proteina čak i nakon toplinske obrade.

Ovo istraživanje jasno ističe potencijal RuBisCO-a za povećanje biljnih proteina u hrani na bazi pšenice.

2.5. AMBALAŽA

Materijali za pakiranje koriste se kako bi se zaštili proizvodi od okoline i usporilo kvarenje prehrambenih proizvoda, produljio rok trajanja, održala kvaliteta hrane. Uglavnom se koriste materijali iz petrokemijskih izvora jer imaju brojne prednosti: raspoloživi su, može se lako kontrolirati propusnost plinova i izdržljivi su. Najčešće se koriste polietilen niske gustoće (PE-LD), polipropilen (PP), poli(vinil-klorid) (PVC), poli(etilen-tereftalat) (PET), polietilen visoke gustoće (PE-HD) i polistiren (PS). S druge strane ovi materijali ne mogu se lako razgraditi, stvaraju mnogo topline i ispušnih plinova kad se spaljuju što uzrokuje globalne probleme onečišćenja okoliša (Ncube i sur., 2020, Zhang i Mittal, 2010).

Problemi povezani s konvencionalnim plastičnim materijalima i njihovo nakupljanje dovode do stalnog istraživanja novih materijala koji se dobivaju iz obnovljivih izvora. Industrija biopolimera zbog svoje ekološke odgovornosti, biorazgradivosti, izvodljivosti i pouzdanosti vodi

prema cirkularnoj ekonomiji. Od svih ekološki prihvatljivih alternativnih materijala, proizvođača izrađenim od biopolimera koji su dobiveni iz biomase pridonosi se posebna pozornost zbog njihove potencijalne biorazgradivosti i obnovljivosti. Osim toga, biopolimeri se često proizvode od materijala koji su nusprodukti ili otpad poljoprivredne i prehrambene industrije čime se može smanjiti količina otpada. Biopolimeri se s obzirom na izvor osnovne sirovine, mogu podijeliti u tri skupine: polisaharidi (celuloza, škrob, pektin), proteini (pšenični gluten, soja, kazein, proteini sirutke) i lipidi (voskovi i masne kiseline) (Senthilkumaran, 2022, Gómez-Estaca i sur., 2016). U nastavku će biti fokus na biopolimerima od proteina.

Proteini sadrže veliku raznolikost funkcijskih skupina koje se mogu fizički, kemijski ili enzimski izmijeniti kako bi se dobila određena svojstva za svaku specifičnu primjenu. Proteini imaju svojstva koja su poželjna za pakiranje hrane, a to su: dobra optička svojstva kao što su sjaj i prozirnost te dobra barijera na masti. Glavna mana im je velika osjetljivost na vodu, što može narušiti prethodno navedena svojstva i selektivna propusnost za plinove (imaju visoku propusnost za CO₂ i O₂). Međutim, hidrofilnost može biti od koristi za razvoj aktivnih pakiranja, koja mogu ispuštati funkcionalne komponente u materijal (Gómez-Estaca i sur., 2016).

2.5.1. Elektropredenje

Elektropredenje je jedna od najnovijih metoda proizvodnje pametnih ambalaže. Tehnika je jednostavna, učinkovita i jeftina, a njome se mogu proizvesti vlakna bez tkanja. Koristi elektrostatičke sile za proizvodnju finih vlakana iz polimernih otopina ili talina, te tako vlakna imaju manji promjer (na nanometarskoj i mikrometarskoj skali) i veću površinu. Ovim bi se procesom moglo sintetizirati vlaknaste materijale veće površine i poroznosti, koji bolje reagiraju na promjene okoline i imaju veliki potencijal kontrolirati otpuštanje ugrađenih spojeva (Mohammadi i sur., 2020, Bhardwaj i Kundu, 2010).

Jedna od glavnih prednosti materijala dobivenih elektroprednjem je da mogu hvatati bioaktivne spojeve i omogućiti njihovo sporo otpuštanje čime se poboljšava kvaliteta i funkcionalnost ovih materijala. Mogu se dodavati antioksidansi i antimikrobna sredstva. Također se i u elektropredena vlakna mogu ugrađivati senzori za praćenje kvalitete hrane unutar i izvan pakovine. Mogu se pratiti promjene pH, detektirati plinovi poput amonijaka, sumporovodika, vodika, para alkohola, ali i detektirati mikrobi (Sameen i sur., 2021).

Proteini su zbog amfifilne prirode izazvali veliki interes za razvoj vlakana na bazi proteina

elektropredenjem. Mogu stvarati veze s brojnim bioaktivnim spojevima. Međutim, elektropredenje proteina nije jednostavno zbog kompleksne sekundarne i tercijarne strukture, pa se daje prednosti proteinima koji imaju konformaciju uzvojnice. Za globularne proteine nije moguće osigurati dovoljno ispreplitanja tijekom elektropredenja zbog male međusobne interakcije. Uspješno elektropredenje globularnih proteina moglo bi se osigurati denaturacijom, korištenjem odgovarajućih otapala i miješanjem s drugim polimerima (Zhang i sur., 2020).

Elektropredena vlakna koriste se za pakiranje suhe hrane kao što su brašno, riža, žitarice i suho voće, voće, povrće, meso i različite kuhane namirnice (Sameen i sur., 2021).

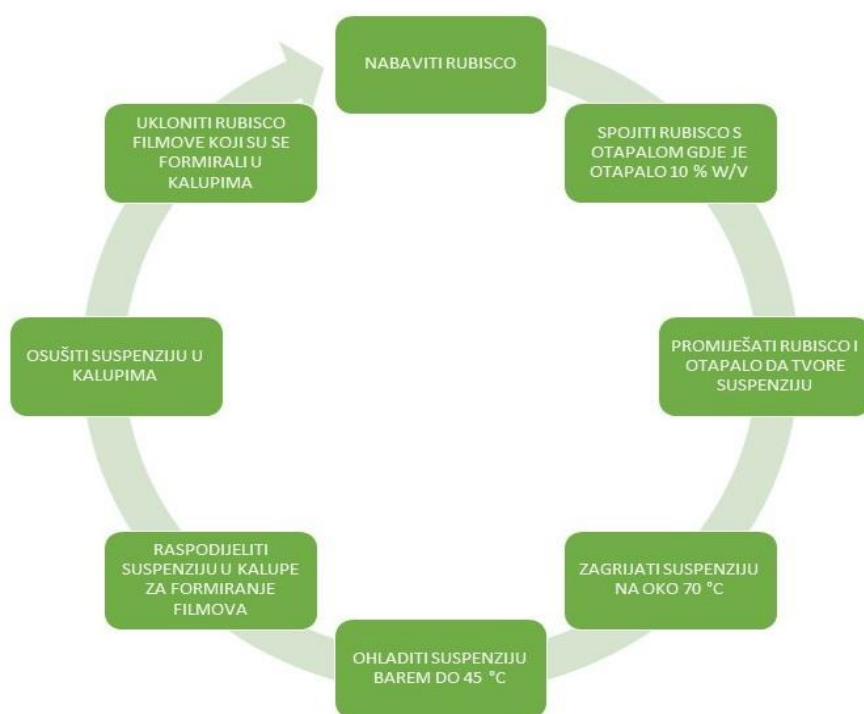
2.5.2. Biofilmovi

Novi materijali i tehnologije pakiranja mogu se stvoriti razvojem aktivnih i pametnih biofilmova (Chaudhary i sur., 2022).

Konvencionalni proteinski filmovi mogu koristiti proteine iz različitih izvora. Predloženo je korištenje filmova iz obilnijih izvora kao što su soja i kazein iz mlijeka, ali se oni tradicionalno koriste kao tradicionalni izvori hrane pa bi bilo poželjno koristiti neke druge proteine koji nisu izvor hrane kao što su proteini iz aflaafila i duhana (Sebastian i sur., 2018), ali i proteini iz lišća šećerne repe (Shen, 2015).

Proteinski filmovi predstavljaju dobru barijeru za kisik pri niskoj relativnoj vlažnosti, dobra mehanička svojstva i zamućenost. Međutim, osjetljivi su na vlagu i propusni su na vodenu paru. Svojstva proteinskih filmova mogu se poboljšati kemijskim, enzimskim, radijacijskim tretmanima i tretiranjem hidrofobnim agensima. Kemijskim tretiranjem kiselinama, lužinama i sredstvima za umrežavanje mogu se poboljšati struktura lanca, permeabilnost i čvrstoća vlakana. Enzimi se koriste kao sredstva za umrežavanja koji povećavaju veze između lanaca makromolekula i tako povećavaju mehaničku snagu i smanjuju propusnost za plinove i vodenu paru. Najčešći enzimi koji se koriste su: transglutaminaza, lipooksigenaza, lizin oksidaza, polifenol oksidaza i peroksidaza. Radijacija uzrokuje promjene u prostornoj strukturi proteina, oksidaciju aminokiselina, raskid kovalentnih veza i formiranje slobodnih radikala proteina. Zatim se proteini mogu prevesti u granule pomoću hidrofobnih i elektrostatskih interakcija i disulfidnih veza. Proteinskim filmovima mogu se dodavati lipidni filmovi radi boljeg otpora na vlagu. Lipidni filmovi poboljšavaju fleksibilnost filmova, ali mogu lošije utjecati na mehanička svojstva proteinskih filmova (Pirsa i Aghbolagh Sharifi, 2020).

Sebastian i sur. (2018) patentirali su način dobivanja filmova iz proteina RuBisCO-a. Slika 5 prikazuje postupak dobivanja RuBisCO filmova.



Slika 5. Primjer metode proizvodnje RuBisCO filmova (*prema* Sebastian i sur., 2018)

RuBisCO filmovi potencijalno bi se mogli koristiti za pakiranje prehrambenih i neprehrambenih proizvoda. U nekim izvedbama RuBisCO film može biti jestiv. Također se može koristiti za enkapsuliranje hrane ili farmaceutskih proizvoda za ljudsku potrošnju, kao omot za neke prehrambene proizvode, ili se može ugraditi u omote i vrećice koje se mogu koristiti u kombinaciji s prehrambenim proizvodima (Sebastian i sur., 2018).

3. ZAKLJUČCI

1. Korištenjem nusproizvoda poljoprivredne industrije pridonosi se ostvarivanju ciljeva održivog razvoja. Brojni nusproizvodi bogati su visokovrijednim spojevima (proteinima) čime bi se mogao riješiti problem nedostatak hrane u svijetu. Razvijaju se novi proizvodi koji utječu na gospodarski razvoj. Smanjuju se količine otpada što smanjuje štetan utjecaj na okoliš.
2. Listovi šećerne repe pokazali su se kao dobar i održiv izvor visokovrijednih spojeva, posebice proteina RuBisCO-a.
3. RuBisCO je atraktivan zbog svoje nutritivne vrijednosti (dobar je izvor esencijalnih aminokiselina), dobre probavljivosti i ima poželjna fizikalno-kemijska i funkcionalna svojstva. Zbog ovih svojstava mogao bi se koristiti kao funkcionalni sastojak u širokom rasponu proizvoda i mogao bi zamijeniti ili djelomično zamijeniti proteine s lošijim funkcionalnim svojstvima.
4. RuBisCO bi također mogao pronaći primjenu i u industriji pakiranja. Mogao bi se koristiti u pametnom i aktivnom pakiranju, a atraktivnim ga čini njegova sposobnost vezanja CO₂ iz atmosfere.
5. Zasad su provedena samo istraživanja u laboratorijima te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se proces proizvodnje RuBisCO-a iz šećerne repe mogao podići na industrijsku razinu.

4. POPIS LITERATURE

Aiking H, de Boer J (2020) The next protein transition. *Trend Food Sci Tech* **105**, 515-522. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.008>

Aman Mohammad M, Hosseini SM, Yousefi M (2020) Application of electrospinning technique in development of intelligent food packaging: A short review of recent trends, *Food Sci Nutr* **8**, 4656– 4665. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1781>

Andersson I (2008) Catalysis and regulation in RuBisCO. *J exp bot* **59(7)**, 1555-1568. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern091>

Anonymous 1 (2021) <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=52482>>. Pristupljeno 28. 5. 2022.

Anonymus 2 (2020) <<https://www.vrtlarica.com/secerna-repa/>> Pristupljeno: 27.6.2022.

Barbeau WE, Kinsella JE (1988) Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) from green leaves-potential as a food protein. *Food Rev Int* **4(1)**, 93-127. <https://doi.org/10.1080/87559128809540823>

Bhardwaj N, Kundu SC (2010) Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Bio-technol adv* **28(3)**, 325-347. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>

Chaudhary V, Punia Bangar S, Thakur N, Trif M (2022) Recent advancements in smart biogenic packaging: Reshaping the future of the food packaging industry. *Polym* **14(4)**, 829. <https://doi.org/10.3390/polym14040829>

Day L (2013) Proteins from land plants–potential resources for human nutrition and food security. *Trend Food Sci Tech* **32(1)**, 25-42. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.05.005>

de Jong A, Nieuwland M (2011) Literature study on the properties of RuBisCO. TNO.

Di Stefano E, Agyei D, Njoku EN, Udenigwe CC (2018) Plant RuBisCO: An underutilized protein for food applications. *J Am Oil Chem Soc* **95(8)**, 1063-1074. <https://doi.org/10.1002/aocs.12104>

Ducrocq M, Boire A, Anton M, Micard V, Morel MH (2020) RuBisCO: A promising plant protein to enrich wheat-based food without impairing dough viscoelasticity and protein polymerisation. *Food Hydrocolloid* **109**, 106101. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106101>

European commission (datum nepoznat) Development of plant proteins in EU. <https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/plant-products/cereals/development-plant-proteins_en>. Pristupljeno 12.6.2022.

Gómez-Estaca J, Gavara R, Catalá R, Hernández-Muñoz P (2016) The potential of proteins for producing food packaging materials: A review. *Packag Technol Sci* **29(4-5)**, 203-224. <https://doi.org/10.1002/pts.2198>

Hadidi M (2019) Optimization of extraction of protein from alfalfa leaf (*medicago sativa*) for human consumption (Doctoral dissertation), Universitat de Lleida.

Kiskini A (2017) Sugar beet leaves: from biorefinery to techno-functionality (Doctoral dissertation), Wageningen University and Research.

Kiskini A, Vissers A, Vincken JP, Gruppen H, Wierenga PA (2016) Effect of plant age on the quantity and quality of proteins extracted from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *J agr food chem* **64(44)**, 8305-8314. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03095>

Kubien DS, Brown CM, Kane HJ (2011) Quantifying the amount and activity of Rubisco in leaves. *Methods Mol Biol* **684**, 349-362. doi: 10.1007/978-1-60761-925-3_27

LORA (2019) Što je održivi razvoj. LORA – laboratorij održivog razvoja <https://lora.bioteka.hr/sto-je-odrzivi-razvoj/> Pristupljeno 27.6.2022.

Martin AH, Castellani O, de Jong GA, Bovetto L, Schmitt C (2019) Comparison of the functional properties of RuBisCO protein isolate extracted from sugar beet leaves with commercial whey protein and soy protein isolates. *J Sci Food Agr* **99(4)**, 1568-1576. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9335>

Martin AH, Nieuwland M, de Jong GA (2014) Characterization of heat-set gels from RuBisCO in comparison to those from other proteins. *J agr food chem* **62(44)**, 10783-10791. <https://doi.org/10.1021/jf502905g>

Ncube LK, Ude AU, Ogunmuyiwa EN, Zulkifli R, Beas IN (2020) Environmental impact of food packaging materials: A review of contemporary development from conventional plastics to polylactic acid based materials. *Mater* **13(21)**, 4994. <https://doi.org/10.3390/ma13214994>

Nynäs AL (2018) White proteins from green leaves in food applications. A literature study. Alnarp: Sveriges lantbruksuniversitet. (Introductory paper at the Faculty of Landscape Architecture, Horticulture and Crop Production Science)

O'Donnelly K, Zhao G, Patel P, i sur. (2014) Isolation and kinetic characterisation of hydrophobically distinct populations of form I Rubisco. *Plant methods*, **10(1)**, 1-11. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-17>

ODRAZ (datum nepoznat) Održivi razvoj. ODRAZ - održivi razvoj <https://www.odraz.hr/nase-teme/odrzivi-razvoj/odrzivi-razvoj/> Pristupljeno 12.6.2022.

Pirsa S, Aghbolagh Sharifi K (2020) A review of the applications of bioproteins in the preparation of biodegradable films and polymers. *J Chem Lett* **1(2)**, 47-58. doi: 10.22034/jchemlett.2020.111200

Rogers A, Gibon Y (2009) Enzyme kinetics: theory and practice. In *Plant metabolic networks* . Springer, New York, NY. str. 71-103

Sameen DE., Ahmed S, Lu R, Li R, Dai J, Qin W, Zhang Q, Li S, Liu Y (2021) Electrospun nanofibers food packaging: Trends and applications in food systems. *Crit Rev Food Science* 1-14. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1899128>

Sebastian A, Mua JP, McClanahan N, Eni SE, Jackson TJ., Johnson S (2018) RuBisCo Protein-Based Films. Patent US15623006

Seemann JR, Badger MR., Berry JA (1984) Variations in the specific activity of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase between species utilizing differing photosynthetic pathways. *Plant Physiol* **74**(4), 791-794. <https://doi.org/10.1104/pp.74.4.791>

Senthilkumaran A, Babaei-Ghazvini A, Nickerson MT, Acharya B (2022) Comparison of protein content, availability, and different properties of plant protein sources with their application in packaging. *Polym* **14**(5), 1065. <https://doi.org/10.3390/polym14051065>

Shen Z (2015) *Development and characterization of flexible films made of sugar beet lignocellulose*, (Doctoral dissertation) Michigan State University.

Sim SYJ, Srv A, Chiang JH, Henry CJ (2021) Plant proteins for future foods: A roadmap. *Food*. **10**(8), 1967. <https://doi.org/10.3390/foods10081967>

Skunca D, Romdhana H, Brouwers R (2021) RuBiSCO protein production – LCA approach. *MEST Journal* **9**(1), 175-183. doi:10.12709/mest.09.09.01.20

Spreitzer RJ, Salvucci ME (2002) RuBisCO: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu rev plant biol* **53**, 449. DOI: [10.1146/annurev.arplant.53.100301.135233](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135233)

Sreejyothi P, Mandal SK (2020) From CO₂ activation to catalytic reduction: a metal-free approach. *Chem Sci* **11**(39), 10571-10593. DOI: [10.1039/D0SC03528A](https://doi.org/10.1039/D0SC03528A)

Tabita FR, Satagopan S, Hanson TE, Kreel NE, Scott SS (2008) Distinct form I, II, III, and IV Rubisco proteins from the three kingdoms of life provide clues about Rubisco evolution and structure/function relationships. *J exp bot* **59**(7), 1515-1524. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm361>

Tenorio AT (2017) Sugar beet leaves for functional ingredients (Doctoral dissertation), Wageningen University and Research.

Udenigwe CC, Okolie CL, Qian H, Ohanenye IC, Agyei D, Aluko RE (2017) Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase as a sustainable and promising plant source of bioactive peptides for food applications. *Trends Food Sci Tech* **69**, 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.001>

Van de Velde F, Alting A, Pouvreau L (2011) From waste product to food ingredient: The extraction of abundant plant protein RuBisCO. *New food* **14**(10), e13.

Vukadinović V, Jug I, Đurđević B (2014) Ekofiziologija bilja. *Sveučilišni udžbenik. Neformalna savjetodavna služba, Osijek*, str. 37.

Zhang C, Li Y, Wang P, Zhang H (2020) Electrospinning of nanofibers: Potentials and perspectives for active food packaging. *Compr Rev Food Sci F* **19**(2), 479-502. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12536>

Zhang H, & Mittal G (2010) Biodegradable protein-based films from plant resources: a review. *Environ prog sustain* **29**(2), 203-220. <https://doi.org/10.1002/ep.10463>

Izjava o izvornosti

Ja Irena Zanini izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

I. Zanini
Vlastoručni potpis