

Utjecaj visoknaponskog električnog pražnjenja na prinos sekundarnih biljnih metabolita i proteina iz lista šećerne repe

Ritoša, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:391674>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-08**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2023.

Ema Ritoša

**UTJECAJ VISOKONAPONSKOG
ELEKTRIČNOG PRAŽNJENJA NA
PRINOS SEKUNDARNIH BILJNIH
METABOLITA I PROTEINA IZ
LISTA ŠEĆERNE REPE**

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 Ježek Jambrak, te uz pomoć Josipe Dukić, mag. ing.



This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 PRIMA programme under grant agreement No: 2032

Ovaj diplomski rad dio je multidisciplinarnog projekta FunTomP—Functionalized Tomato Products (<https://funtomp.com/>). Financiran je sredstvima PRIMA H2020 GA2032. Koordinator projekta je Dr. Mecit Halil Oztop.

This thesis is part of the multidisciplinary project FunTomP—Functionalized Tomato Products (<https://funtomp.com/>). It was financed by PRIMA H2020 GA2032 funds. The project coordinator is Dr. Mecit Halil Oztop.

Zahvala

Prije svega, želim iskazati veliku zahvalnost prof.dr.sc. Anet Režek Jambrak i mag.ing. Josipi Dukić na pruženim savjetima, vremenu, ljubaznosti i strpljenju kojeg su mi iskazale u procesu pisanja rada.

Hvala Bogu i roditeljima koji su mi dali dar života.

Hvala mojim sestrama Klari, Marti i Ani, što su uvijek bile tu, u lijepim i teškim trenucima moga studija.

Hvala mami/baki Heleni za sve "popotnice", riječi podrške i utjehe.

Hvala Mihaeli na ramenu za plakanje, pomoći i razumijevanju, ljubavi, strpljenju i podršci.

Hvala Dori na predivnim uspomenama koje će zauvijek ostati najljepši dio ovog dugog studiranja.

Hvala Blažu što me naučio da živim u trenutku i budem zahvalna. Neka ti je vječni mir i pokoj.

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: Prehrambeno inženjerstvo

UTJECAJ VISOKNAPONSKOG ELEKTRIČNOG PRAŽNJENJA NA PRINOS SEKUNDARNIH BILJNIH METABOLITA I PROTEINA IZ LISTA ŠEĆERNE REPE

Ema Ritoša, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058210182

Sažetak: Lišće šećerne repe je glavni otpad u proizvodnji šećera te stoga čini potencijalni i održivi izvor proteina i fenolnih spojeva za prehrambenu industriju. Cilj ovog istraživanja je odrediti utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja (eng. *High voltage electrical discharge*- HVED), na prinos ekstrakcije sekundarnih biljnih metabolita i proteina iz lista šećerne repe te usporediti rezultate s konvencionalnom metodom toplinske ekstrakcije. Ukupni proteini i fenoli u ekstraktima određivani su spektrofotometrijski. HVED potpomognutom ekstrakcijom dobiven je 13,6 % veći prinos proteina u odnosu na toplinsku. Toplinskom ekstrakcijom pri 60 °C u trajanju od 3 i 6 minuta dobiveni su 8,5 % veći prinosi ukupnih fenola u odnosu na HVED. Statističkom analizom u programu STATGRAPHICS utvrđeno je da vrijeme tretmana i napon nemaju statistički značajan utjecaj na pH, električnu vodljivost, prinos ukupnih proteina i prinos ukupnih fenola HVED tretiranih uzorka ($p > 0,05$). Duljina toplinske ekstrakcije ima statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) na prinos ukupnih proteina i ukupnih fenola.

Ključne riječi: *visokonaponsko električno pražnjenje, list šećerne repe ekstrakcija, proteini, fenoli*

Rad sadrži: 50 stranica, 5 slika, 7 tablica, 68 literaturnih navoda, 10 priloga

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: Josipa Dukić mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Sven Karlović (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak (mentor)
3. prof. dr. sc. Anita Slavica (član)
4. izv. prof. dr. sc. Mojca Čakić Semenčić (zamjenski član)

Datum obrane: 6. srpnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of general Programs
Laboratory for Sustainable development
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology
Graduate university study programme: Food Engineering

THE INFLUENCE OF HIGH-VOLTAGE ELECTRIC DISCHARGE ON THE YIELD OF SECONDARY PLANT METABOLITES AND PROTEINS FROM SUGAR BEET LEAVES

Emma Ritoša, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058210182

Abstract: Sugar beet leaves are the main waste of sugar production and therefore constitute a potential and sustainable source of protein and phenolic compounds for the food industry. The aim of this work was to determine the impact of high voltage electrical discharge (HVED) on the extraction yield of secondary plant metabolites and proteins from sugar beet leaves. Obtained results were compared to results of conventional thermal extraction. Total proteins and phenols in the extracts were determined spectrophotometrically. By means of HVED-assisted extraction, 13,6 % higher protein yield was obtained, compared to thermal extraction. For thermal extraction at 60 °C for 3 and 6 minutes, an 8,5 % higher yield of total phenols was obtained compared to HVED. Through statistical analysis in the STATGRAPHICS program, it was determined that treatment time and voltage have no statistically significant effect on pH, electrical conductivity, yield of total proteins and yield of total phenols of HVED treated samples ($p > 0,05$). The length of thermal extraction has a statistically significant effect ($p < 0,05$) on the yield of total proteins and total phenols.

Keywords: *high voltage electric discharge, sugar beet leaf extraction, proteins, phenols*

Thesis contains: 50 pages, 5 figures, 7 tables, 68 references, 10 supplements

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

Co-mentor: Josipa Dukić, MSc

Reviewers:

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

Thesis defended: July 6th, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. ŠEĆERNA REPA	3
2.1.1. List šećerne repe	4
2.2. PROTEINI.....	5
2.2.1. Funkcionalne karakteristike i primjena	5
2.2.2. RuBisCO.....	6
2.3. SEKUNDARNI BILJNI METABOLITI	7
2.3.1. Fenolni spojevi	8
2.4. EKSTRAKCIJA	8
2.4.1. Zelene metode ekstrakcije	10
2.5. VISOKONAPONSKO ELEKTRIČNO PRAŽNENJE.....	12
2.5.1. Mehanizam djelovanja.....	12
2.5.2. Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1 Materijali	16
3.1.1. Uzorak	16
3.1.2. Aparatura i pribor	16
3.1.3. Kemikalije i reagensi	17
3.2. Metode rada.....	18
3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem.....	19
3.2.2 Toplinska ekstrakcija.....	22
3.2.3. Određivanje udjela ukupnih fenola.....	22

3.2.4. Određivanje ukupnih proteina metodom po Lowry-u	24
3.2.5. Određivanje pH vrijednosti	26
3.2.6. Određivanje električne vodljivosti.....	26
3.2.7. Određivanje suhe tvari sušenjem do konstantne mase	27
3.2.8. Statistička obrada podataka	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. Rezultati parametara dobivenih nakon HVED ekstrakcije	30
4.2. Rezultati ispitivanih svojstava nakon toplinske ekstrakcije.....	32
4.3. Usporedba rezultata provedenih ekstrakcija	33
4.3.1. Ukupni proteini.....	33
4.3.2. Ukupni fenoli.....	34
4.3.3. pH	35
4.3.4. Električna vodljivost.....	36
4.4. Rezultati statističke obrade podataka	37
4.4.1. Rezultati statističke obrade i optimiranja parametra za uzorak LHN.....	37
4.4.2. Rezultati statističke obrade i optimiranja parametara za uzorak LHA	39
4.5. Rezultati statističke obrade podataka toplinskih ekstrakcija.....	42
5. ZAKLJUČCI	43
6. LITERATURA	44

1. UVOD

Porastom svjetske populacije, raste i potražnja za životinjskim proteinima koji čine važan dio ljudske prehrane. Međutim, proizvodnja proteina animalnog izvora, nosi sa sobom mnoge negativne posljedice: emisiju stakleničkih plinova, devastaciju okoliša i onečišćenje voda. Zbog toga se sve više istražuju mogućnosti izolacije proteina iz alternativnih sirovina kao što su zelena lisnata biomasa, mikro alge i insekti.

List šećerne repe je otpad industrije šećera te ima velik potencijal kao sirovina za izolaciju proteina. Proteini lišća, osim optimalnog sastava aminokiselina, imaju potencijalna funkcionalna svojstva (emulgiranje, geliranje, pjenjenje). Osim toga bogat su izvor sekundarnih biljnih metabolita koji imaju širok spektar primjena u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (arome, boje, parfemi, dodatci prehrani, herbicidi, fungicidi). Proizvodnja biljnih proteina za ljudsku prehranu, predstavlja izazov mnogim tehnologizima i znanstvenicima zbog njihovih složenih strukturnih obilježja i interakcije s drugim makromolekulama u biljnom matriksu.

Nadalje, manjak osviještenosti šire populacije o alternativnim izvorima proteina, limitirane funkcionalne karakteristike, loša probavljivost, prisutnost alergena i anti-nutrijenata te manjak esencijalnih aminokiselina u istima, ukazuju da je potrebno provesti daljnja istraživanja, kako bi se unaprijedila tehnologija te dobio kvalitetan prehrambeni proizvod.

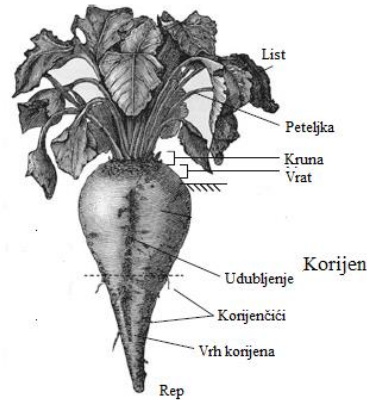
Postoje različite metode za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz biljaka. Zbog brojnih nedostataka tradicionalnih, konvencionalnih metoda, sve veću primjenu dobivaju inovativne "zelene" tehnike ekstrakcije koje su ekonomične i ekološki prihvatljive. Jedna od njih je i visokonaponsko električno pražnjenje (engl. *High voltage electrical discharge*, HVED), ne toplinska tehnika kojom se generira plazma, djelomično ili potpuno ionizirajući plin. Neke od praktičnih aplikacija ove tehnologije su: pročišćavanje voda, inaktivacija mikroorganizama (bakterija, virusa, kvasaca), elektro-hidrauličko usitnjavanje i ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz biljaka.

Cilj ovog rada je ispitati utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja na prinos ukupnih fenola i ukupnih proteina iz lista šećerne repe te usporediti metodu s konvencionalnom, toplinskom ekstrakcijom. Prinosi fenola i proteina određivani su spektrofotometrijski, a rezultati su statistički obrađeni kako bi se utvrdili optimalni uvjeti procesa ekstrakcije i statistički značajni parametri.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ŠEĆERNA REPA

Šećerna repa (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *altissima*) (slika 1) je dvogodišnja biljka iz porodice štirovki - *Amaranthaceae*. U prvoj godini rasta razvija zadebljali korijen i ružu listova, a u drugoj stabljiku, cvijet, plod i sjeme (Bradshaw, 2010). Na području Mediterana uzgajala se još 1000 godina prije nove ere, a kasnije se proširila Rimskim carstvom. Potkraj 16. stoljeća, došlo je do saznanja kako stočna repa sadrži istu vrstu šećera kao i šećerna trska te je selekcijom razvijena prva sorte šećerne repe “*Weisse schlesische Rübe*” (bijela šleska repa) (Kiple i Ornelas, 2000). U sjevernoj hemisferi, obično se sije u kasnu zimu ili rano proljeće. Ovisno o klimatskim uvjetima i uvjetima tla, usjev se bere nakon 5-9 mjeseci rasta. Dozrijelo korijenje vadi se iz zemlje mehanički te se transportira u tvornicu ili slaže u skladišne hrpe. Peteljke i listovi se uklanjaju prije prerade zbog niskog sadržaj šećera te visoke koncentracije nečistoća. Korijen se prerađuje u komercijalni bijeli šećer. Melasa, koja se dobiva kao nusprodukt prilikom proizvodnje, koristi se za stočnu hranu te proizvodnju alkohola, glutamata i kvasca. Može se i nadalje pročišćavati do čiste saharoze molekularnim sitima i ionskom izmjenom (Bradshaw, 2010). Kao što je već napomenuto, šećerna repa primarno se uzgaja zbog korijena koji je sirovina za proizvodnju bijelog konzumnog šećera. Otprilike jedna četvrtina svjetske proizvodnje šećera dobiva se iz repe, a ostatak se proizvodi od trske (*Saccharum officinarum* L.). Uz melasu i lišće, nusprodukti obrade šećerne repe uključuje repine rezance (koriste se za stočnu hranu) te saturacijski mulj (koristi se kao poboljšivač tla). Kod prinosa šećerne repe od 50 t/ha čistoga korijena, proizvede se 6,25 t šećera, 2,7 t suhih repinih rezanaca, 2,1 t melase, 2,5 t saturacijskoga mulja i 30 t/ha svježega repina lišća, koje služi za stočnu hranu ili ostaje na polju kao organska masa za gnojenje (Hrvatska enciklopedija 2021a).



Slika 1. Šećerna repa (prema Bradshaw, 2010)

2.1.1. List šećerne repe

Listovi čine 20-34 % biljke. Počinju nicati u obliku kotiledona, prvo se nalaze u paru, a rastom se odvajaju. Svoju maksimalnu brojnost i veličinu dostižu u mjesecu kolovozu. List se sastoji od peteljke i plojke. Peteljka ima trokutasti oblik dok je plojka ovalna ili srcolika. Stariji listovi su smješteni na rubovima biljke, dok mladi rastu na sredini glave (Balentović, 2016). Bogati su mineralnim tvarima (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, Zn, Si), vitaminima (A, B, C, D, E, K), fitokemijskim spojevima te sekundarnim biljnim metabolitima (Fragoso i sur., 1993). Lišće šećerne repe u prosjeku sadrži $88,5 \pm 1,6$ % vode. U suhoj tvari sadrži oko $15,5 \pm 1,7$ % proteina, i $3,4 \pm 1,0$ % masti. Niski udio masti u listovima je tipičan odn. u lišću se većinom akumuliraju ugljikohidrati, koji pridonose strukturi i rastu biljke (Tamayo Tenorio, 2017). U nekim studijama (Lammens i sur., 2012; Merodio i Sabater 1988) zabilježen je viši sadržaj proteina (22,8 %) što bi značilo prinos od 450-600 kg proteina po hektaru zasađene šećerne repe. Ova vrijednost je usporediva s prinosom proteina soje (450-600 kg/he) i žitarica (~ 570 kg/he) (van Krimpen i sur., 2013). Na mokroj osnovi, sadržaj proteina u lišću je nizak (3-5 %), no velika količina i dostupnost lisnate biomase, motivirali su istraživanja o potencijalu njihove upotrebe kao izvora proteina (Tamayo Tenorio, 2017; Merodio i Sabater, 1988).

2.2. PROTEINI

Proteini su makromolekule koje grade sve žive organizme. Imaju mnoge funkcionalne, strukturne i regulatorne uloge. Proteine grade aminokiselinski ostatci, povezani peptidnim vezama u lance. Biološka funkcija proteina određena je specifičnom prostornom građom (nativnom konformacijom). Denaturacijom, odnosno gubitkom native konformacije, dolazi do gubitka biološke funkcije proteina (Hrvatska enciklopedija 2021b). Sve biljke sadrže proteine, a koncentracija im varira ovisno o vrsti i stadiju zrelosti (sadržaj proteina opada sazrijevanjem). Udio proteina može se promijeniti skladištenjem i preradom biljnog materijala (Wadhvani i sur., 2014). U lišću su prisutni brojni topljivi i netopjivi proteini koji imaju strukturne i funkcionalne uloge (lipoproteini, strukturni proteini, fotoaktivni pigmenti vezani na proteine, enzimi). Netopljivi proteini su uglavnom membranski proteini u membranama kloroplasta, gdje su vezani na klorofil, karotenoide i lipide. Manji dio proteina lista nalazi se vezan na polisaharide citoskeleta gdje imaju katalitičku ili regulatornu ulogu (Tamayo Tenorio, 2017). Proteini u zelenim listovima, mogu se podijeliti na bijelu i zelenu proteinsku frakciju. Bijelu proteinsku frakciju uglavnom čini enzim RuBisCO, dok se zelena frakcija sastoji od proteina srodnih klorofilu (Nynäs, 2018).

2.2.1. Funkcionalne karakteristike i primjena

Proteini su važan dio kemijskog i fizikalnog sastava hrane. Osim što čine važan dio zdrave i uravnotežene prehrane, imaju i mnoge fizikalne i kemijske karakteristike, odnosno funkcionalna svojstva. Znati svojstva proteina vrlo je važno kako bi se mogle procijeniti njihove potencijalne aplikacije u prehrambenim proizvodima. Nadalje, ključni su jer utječu na karakteristike konačnog proizvoda i time opće prihvaćenosti kod potrošača (Gravel i Doyen, 2019).

Topljivost je temeljno funkcionalno svojstvo proteina, a utječe i na ostala funkcionalna svojstva kao što su geliranje, emulgiranje, pjenjenje, svojstva vezanja vode i masti. Na topljivost proteina utječu unutarnji (struktura, građa, veličina proteina) i vanjski faktori (pH, temperatura, ionska jakost) (di Stefano i sur., 2018).

Neke od uloga koje proteini imaju u prehrambenim proizvodima su: održavanje topljivosti te sprječavanje taloženja (npr. proteina u mlijeku i biljnim napitcima), emulgiranje masti i ulja (npr. majoneza), održavanje polukrute teksture u jogurtima i mesnim alternativama te održavanje

mjehurića plina (sladoledi, cappuccino). Također su prokursori za razne arome tipa pečenog mesa i tostiranih orašastih plodova (Loveday, 2020).

Proteini su kemijski reaktivniji od ugljikohidrata, što može biti prednost i mana: reaktivnost doprinosi funkcionalnosti, no reakcije proteina u visokoproteinskoj hrani mogu narušiti kvalitetu proizvoda (Loveday, 2020). Na primjer, visokoproteinske hranjive pločice često postaju vrlo tvrde kao rezultat agregacije proteina (Loveday i sur., 2010), a čest je problem i geliranje ili sedimentacije proteina u UHT mlijeku (Anema, 2019). Neki proteini životinjskog podrijetla imaju funkcionalna svojstva koje je teško zamijeniti proteinima biljnog podrijetla.

Na primjer, kazein u mlijeku prisutan je u obliku stabiliziranih mineralnih nano-kompleksa odn. micela. Izuzetno je stabilan pri nativnom pH mlijeka, ali se taloži kiseljenjem i enzimskim cijepanjem. Ovakva micelarna struktura je jedinstvena i ne pojavljuje se u proteinima biljnog podrijetla. Nadalje, kada se želatina (dobivena od životinjskog kolagena) otopi u vrućoj vodi i zatim ohladi, formira se hidratizirana proteinska mreža s naslaganim strukturama trostruke spirale, stvarajući prozirne elastične gelove koji se tope u ustima. Modificirani škrob može donekle zamijeniti neke funkcionalne karakteristike želatine, ali niti jedan drugi proteinski sastojak biljnog podrijetla ne može se mjeriti s njihovom mogućnosti želiranja, otapanja i elastičnošću (Loveday, 2020).

2.2.2. RuBisCO

Ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (RuBisCO) je enzim Calvin–Benson–Bassham (CBB) fotosintetskog ciklusa u kojem se CO₂ prevodi u prekursorske organske molekule. Život na zemlji gotovo isključivo ovisi o sposobnosti fotosintetskih organizama da prevedu anorganski CO₂ iz atmosfere, u organski ugljik biosfere preko Calvin-Benson-Bassham ciklusa. RuBisCO katalizira primarnu fotosintetsku reakciju redukcije CO₂ (veže se na molekulu akceptora ribuloza-1,5-bisfosfata, nastaju dvije molekule 3-fosfoglicerata) (Andersson i Backlund, 2008). Čini 20-50 % proteina u lišću i 5-25 % proteina u algama i fotosintetskim prokariotima što ga čini najzastupljenijim proteinom na zemlji (Ellis, 1979). Nalazi se u stromi kloroplasta biljne stanice (Andersson i Backlund, 2008). Čini gotovo polovicu proteina topive frakcije listova šećerne repe. Građen je od osam velikih (53 kDa) i osam malih podjedinica (14 kDa) koje zajedno čine kompleksnu molekulu (550 kDa) (Tamayo Tenorio, 2017). RuBisCO još nema primjenu kao

sastojak u ljudskoj prehrani zbog teškoće ekstrakcije funkcionalnog koncentrata bez neugodnog priokusa. Osim nutritivnog potencijala, ima i poželjna funkcionalna svojstva: kapacitet za stvaranje pjene sličan proteinima bjelanjka, dobru topljivost pri pH vrijednosti hrane te mogućnost tvorbe gelova (Ducrocq i sur., 2021). Prema istraživanju di Stefano i sur. (2018) emulgirajuća aktivnost RuBisCO-a je manja od seruma goveđeg albumina i proteina soje, ali veća od proteina bjelanjka.

2.2.2.1. Nutritivna vrijednost

RuBisCO kao najzastupljeniji protein na zemlji, posjeduje velik potencijal primjene u ljudskoj prehrani zbog izvrsnog sastava esencijalnih aminokiselina. Proteini lišća, posebno RuBisCO, primijećeni su kao potencijalni izvor proteina za ljudsku prehranu već 1940-ih zbog široke dostupnosti (Nynäs, 2018). Izvor je treonina, valina, izoleucina, triptofana i leucina (Zengin i sur., 2012) kao i bioaktivnih peptida (specifičnih proteinski fragmenata, izgrađenih od 2-20 aminokiselinskih ostataka) (di Stefano i sur., 2018). Međutim, unatoč tome što ima visoku nutritivnu vrijednost i ne uzrokuje alergije, neobrađene biljno-proteinske frakcije RuBisCO-a, često sadrže antinutrijente, proteaza inhibitore, hemaglutinine, fitate i polifenolne spojeve. Antinutrijenti mogu smanjiti bioraspoloživost i biodostupnost proteina i mikronutrijenata te posljedično narušavaju kvalitetu prehrambenih proizvoda (di Stefano i sur., 2018).

2.3. SEKUNDARNI BILJNI METABOLITI

Metaboliti su među-produkti i produkti metabolizma. Ugljikohidrati, lipidi i proteini su primarni metaboliti te su neophodni za rast i metabolizam (Tiwari i Rana, 2015). Sekundarni biljni metaboliti ne sudjeluju izravno u rastu i razvoju biljke te njihov nedostatak nužno ne rezultira odumiranjem organizma, ali utječe na njenu dugovječnost, plodnost i izgled (Zhaoa i sur., 2005). Čine bitni dio u obrambenom mehanizmu biljke, tj. štite ju od biljojeda i patogenih mikroorganizama.

Sekundarni biljni metaboliti primjenjuju se u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji kao arome, boje, parfemi, dodatci prehrani, herbicidi, fungicidi. Mogu se klasificirati u skupine prema kemijskoj strukturi, topljivosti ili putevima sinteze, a najčešće se dijele u skupine (Tiwari i Rana, 2015): fenoli spojevi, alkaloidi i flavonoidi, terpeni i steroidi.

2.3.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su vrlo raznolika skupina sekundarnih biljnih metabolita čiju osnovnu strukturu čini aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (González Mera i sur., 2019). Dijele se u skupine, najčešće prema broju ugljikovih atoma u molekuli. Prema tome razlikujemo: jednostavne fenole i benzokinone, fenolne kiseline, acetofenone, feniloctenu kiselinu, hidroksicimetnu kiselinu, fenilpropan i kumarin, naftokinon, ksantone, stilbene, antrakinone, flavonoide, lignane, neolignane i lignine (Dai i Russell, 2010). Prisutni su sjemenkama, listovima, cvjetovima, kori, pokožici, mezokarpu voća i povrća, žitaricama, začinskom i aromatskom bilju. Postoji više putova biosinteze fenolnih spojeva, a najvažniji su put šikiminske kiseline i put jabučne kiseline (Cheiner i sur., 2013). Fenolni spojevi imaju brojne funkcije u biljkama, a između ostalog djeluju kao antioksidansi i inhibitori rasta.

Sjemenke nakupljaju značajne količine fenola koje sprječavaju dotok kisika do embrija te tako inhibiraju klijanje (Weidner i sur., 2014). Fenoli se također nakupljaju na površinama lista te tamo zadržavaju do 90 % UV zračenja (González Mera i sur., 2019).

Šećerna repa pripada porodici *Amaranthaceae* u kojoj su od fenolnih spojeva najzastupljenije fenolne kiseline i flavonoidi. Fenolne kiseline (npr. hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina), zajedno s flavonoidnim podskupinama flavonola (npr. kvercetini) i flavona (npr. viteksini) zabilježene su u korijenu i lišću šećerne repe (Gil i sur., 1998; Pyoi sur., 2004). Količina ukupnih fenola u lišću varira ovisno o starosti šećerne repe. Prema istraživanju koje su proveli Vissers i sur., (2017) , ukupni sadržaj fenola u listovima šećerne repe je dvostruko veći u biljkama starim osam mjeseci, u usporedbi s biljkama starim tri mjeseca.

2.4. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je laboratorijski i industrijski postupak izdvajanja tvari iz homogenih smjesa na temelju njihove različite topljivosti u dva otapala koja se međusobno ne miješaju. Dva načina ekstrakcije s obzirom na agregatno stanje dviju faza su čvrsto-tekuće i tekuće-tekuće. Ekstrakcija organskim otapalima jedna je od najraširenijih tehnika pripreme uzoraka, a podrazumijeva otapanje uzorka odgovarajućim organskim otapalom (etanol, metanol, heksan, aceton i sl.) (Rapić, 2008). Tim postupkom dolazi do odjeljivanja smjese tvari na osnovu različite topljivosti u

otapalima koja se koriste u samom procesu ekstrakcije. Omjer koncentracija tvari u otapalima opisuje se Nernstovim zakonom razdijeljenja [1]:

$$K = \frac{c_1}{c_2} \quad [1]$$

pri čemu je K koeficijent razdijeljenja, c_1 (mol/dm) i c_2 (mol/dm) su ravnotežne koncentracije tvari u otapalima.

Organsko otapalo koje se koristi za ekstrakciju mora ispunjavati određene kriterije, kao što su (Rapić, 2008): kemijska inertnost prema ostalim prisutnim tvarima, dobra topljivost željene tvari u otapalu, velika razlika u gustoći i ne previsoko vrelište korištenih otapala, nemogućnost stvaranja emulzija tijekom ekstrakcije.

Kako bi se molekule iz čvrste faze mogle ekstrahirati, potrebno je postići prodiranje otapala do željenih molekula što se postiže zagrijavanjem i usitnjavanjem čvrstog supstrata (Rapić 2008). Uz odabir povoljne ekstrakcijske metode, izbor odgovarajućeg otapala je također od velike važnosti. Za odabir otapala primjenjuje se princip 'slično otapa slično'. Dakle, polarna otapala koriste se za ekstrakciju polarnih tvari, a ne polarna onih ne polarnih (Rasul, 2018).

Tipičan proces ekstrakcije biljnog materijala sadržava sljedeće korake: prikupljanje i provjera autentičnosti uzoraka, sušenje, usitnjavanje, ekstrakcija, filtriranje, koncentracija, sušenje i rekonstitucija.

Na kvalitetu ekstrakta utječe više čimbenika: dijelovi biljke koji se koriste kao polazni materijal, otapalo korišteno za ekstrakciju, metoda ekstrakcije te omjer otapala i biljnog materijala (Gupta i sur., 2012).

Postoji više metoda za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz biljaka, a dijelimo ih na konvencionalne odn. tradicionalne metode i nove, alternativne tzv. zelene metode. Perkolacija, maceracija, toplinska ekstrakcija, Soxhlet ekstrakcija i hidrodestilacija su konvencionalne metode ekstrakcije korištene za dobivanje bioaktivnih spojeva iz biljaka. Široko su primjenjivane metode zbog jednostavne instrumentacije. Međutim, imaju mnoge nedostatke poput: dugotrajnosti procesa, visoke potrošnje otapala i energije, niske selektivnosti ekstrakcije, nemogućnost automatizacije. To rezultira niskim prinosom, pa se ove metode smatraju manje učinkovitima (Gupta i sur., 2012).

2.4.1. Zelene metode ekstrakcije

Zbog brojnih nedostataka konvencionalnih metoda ekstrakcije, sve veću primjenu dobivaju inovativne tehnologije odn., nekonvencionalne, "zelene" tehnike ekstrakcije: ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, ekstrakcija visokim hidrostatskim tlakom, enzimski potpomognuta ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem (HVED) te pulsirajućim električnim poljem (Picot-Allain i sur., 2021). U usporedbi sa konvencionalnim metodama, ove nove tehnologije su ekološki prihvatljivije. Smanjena je potrošnja energije i otapala, povećana učinkovitost i selektivnost procesa, veći su prinosi te je moguća automatizacija procesa (Li i sur., 2019; Gupta i sur., 2012). Međutim, ove tehnike imaju i ograničenja prilikom implementacija i primjene (tablica 1).

Maravić i sur. (2022) uspoređivali su alternativne „zelene“ i konvencionalne metode ekstrakcije ukupnih fenola iz lista šećerne repe. Ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i mikrovalovima pokazale su bolji prinos u usporedbi s ekstrakcijom kruto-tekuće, tekućinskom ekstrakcijom pod visokim tlakom i subkritičnom vodenom ekstrakcijom. Udio pojedinih fenolnih spojeva varirao je s obzirom na primijenjenu tehniku, a viteksin se pokazao kao najzastupljeniji spoj kod svih ispitivanih uzoraka.

Tablica 1. Prednosti i mane novih, zelenih tehnologija ekstrakcije (*prema Picot-Allain i sur., 2021*)

Metoda ekstrakcije	Prednosti	Mane
Ekstrakcija super-kritičnim fluidom	Visoka selektivnost, niska viskoznost i visoka brzina difuzije superkritičnog fluida, poboljšani prijenos mase i prinos, niska radna temperatura, primjena u industrijskim razmjerima, super-kritični CO ₂ se može ponovno upotrijebiti, ekološki prihvatljiva otapala	Visoka cijena, složena konfiguracija sustava, potrebna je obuka radnika, slaba selektivnost prema polarnim spojevima zbog niskog polariteta super-kritičnog CO ₂
Ekstrakcija visokim tlakom	Kratko vrijeme ekstrakcije, potrebna mala količina otapala, poboljšani prinos	Cijena opreme, obuka radne snage
Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija	Kratko vrijeme ekstrakcije, niska potrošnja energije, povećani prinos ekstrakcije, mali kapital potreban za opremu	Neravnomjerno zagrijavanje i pregrijavanje uzorka koji može smanjiti učinkovitost ekstrakcije ili uzrokovati toplinsku razgradnju fenolnih kiselina
Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija	Niska potreba za energijom, kraće vrijeme ekstrakcije, smanjeno korištenje otapala, poboljšani prinos ekstrakcije	Ne selektivna metoda, proizvedena toplina može oštetiti toplinski labilan spoj
Pulsirajuće električno polje	Energetski učinkovita metoda, ne destruktivna, selektivna, ne toplinska, kontinuirana tehnologija, niski troškovi rada, jednostavno skaliranje	Visoka cijena
Enzimski potpomognuta ekstrakcija	Visoka selektivnost, poboljšani prinos, ekološka metoda	Visoka cijena enzima, potrebna, stalna kontrola pH i temperature za optimalno djelovanje enzima
HVED	Učinkovita poracija stanične strukture, smanjena potrošnja otapala, ne termalna tehnika, povećava antioksidativno djelovanje	Slobodnih radikali koji nastaju tretmanom mogu oksidirati ekstrahirane spojeve, smanjena selektivnost, pilot postrojenja zahtijevaju veći unos energije

2.5. VISOKONAPONSKO ELEKTRIČNO PRAŽNJENJE

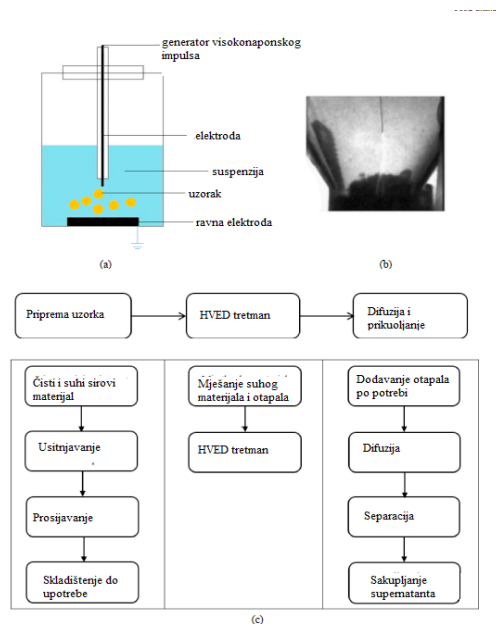
2.5.1. Mehanizam djelovanja

Visokonaponsko električno pražnjenje je nisko energetska i ne toplinska tehnika koja sve se više proučava zbog velikog potencijala primjene u biologiji, kemiji i elektrokemiji. Neke od praktičnih aplikacija ove tehnologije su: pročišćavanje voda, inaktivacija mikroorganizama (bakterija, virusa, kvasaca), elektro-hidrauličko usitnjavanje i ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz biljaka. Prilikom tretiranja biljnog materijala HVED tehnologijom, plin struji u reaktor te se ionizira (odn. dolazi do formiranja plazme) (Nutrizio i sur., 2020). Plazma je jedno od četiri agregatna stanja materije. Materija se pri niskoj temperaturi i energiji nalazi u krutom stanju. Povećanjem ovih parametara, materija prolazi kroz tekuće i plinovito stanje, te na najvećim temperaturama prelazi u stanje plazme. Dakle, plazma je plin u kojem se u ioniziranom stanju nalazi barem jedan dio čestica.

Razlikujemo termalnu i ne termalnu plazmu. Čestice (elektroni, ioni i neutroni) kod termalnih plazmi nalaze se u termičkoj ravnoteži, odnosno na istoj su temperaturi. Kod ne termalne plazme, elektroni imaju različitu elektronsku i ionsku temperaturu te nisu u lokalnoj termičkoj ravnoteži s ionima i neutronima (Kregar, 2008). Elektroni se mogu sudariti s drugim prisutnim molekulama (N_2 , O_2 i H_2O) čime se u plazmi stvaraju sekundarni elektroni, fotoni, ioni i radikali (Jinag i sur., 2013).

Ne termalna plazma, proizvedena koronskim i strujnim pražnjenjima, podrazumijeva stvaranje plazme bez zagrijavanja medija. Iako bi temperatura unutar kanala za pražnjenje mogla biti vrlo visoka, mali volumen i lokalizirana priroda odvodnih kanala omogućuju održavanje umjerene, odnosno sobne temperature. Dakle, za razliku od termalne plazme, primjenom ne termalne plazme, izbjegavaju se veliki toplinski gubici i sprječavaju se oštećenja površina kao što su zidovi reaktora, elektrode, dijelovi reaktora. Piroliza organskih spojeva je moguća, ali budući da su toplinske regije karakterizirane vrlo malim volumenom, termička je razgradnje minimalna (Gasanova, 2013).

Dakle, visokonaponsko električno pražnjenje (eng. *High voltage electrical discharge* -HVED) se temelji na stvaranju električnih pražnjenja (slika 2.b) izravno u vodi što rezultira nizom kemijskih i fizikalnih promjena. Stvara se vruća, lokalizirana plazma, koja emitira UV zrake visokog intenziteta, proizvodi udarne valove i stvara hidroksilne radikale tijekom fotodisocijacije vode. UV zračenje (200-400 nm) mutageno je za stanice, udarni valovi oštećuju staničnu membranu, a hidroksilni radikali dovode do oksidativnog oštećenje stanica (Boussetta i Vorobiev, 2014). Električno pražnjenje u vodi se odvija u dvije faze: fazi prije (koronsko pražnjenje) i poslije raspada (lučno pražnjenje). Za koronski proces pražnjenja karakteristični su slabi udarni valovi, mali broj mjehurića i aktivnih radikala te jako UV zračenje. Prijelazom u lučni proces pražnjenja, povećava se broj mjehurića plazme, pojačavaju udarni valovi, turbulencija i koncentracija slobodnih radikala kao i UV zračenja. Ovi udarni valovi i eksplozije kavitacijskih mjehurića rezultiraju fragmentacijom staničnih membrana te utječu na veličinu čestica (Li i sur., 2019; Barišić i sur., 2020). Formiranje električnog luka između dvije elektrode uronjene u vodu rezultira stvaranje plazme, što je inducirano brzim isparavanjem vode. Brzo širenje volumena plina u nestlačivoj tekućini, stvara snažni kompresijski val čija amplituda ovisi parametrima električnog generatora i količinu energije prisutne u vodi. Nastali val, širi se nadzvučnom brzinom te stupa u interakciju s okolnim strukturama (Claverie i sur., 2014).



Slika 2. a) shematski prikaz šaržnog HVED sistema b) fotografija visokonaponskog električnog pražnjenja c) shematski prikaz šaržne HVED ekstrakcije (prema Li i sur., 2019)

2.5.2. Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem

Posljednjih godina HVED tehnologija se primjenjuje u prehrambenoj industriji i to u svrhu poboljšanja ekstrakcije biološki aktivnih spojeva iz različitih sirovina (Li i sur., 2019). U usporedbi s kontrolom, pokazalo se da ekstrakcija HVED-om može smanjiti potrebnu temperaturu i vrijeme difuzije kao i sadržaj etanola u difuzijskom otapalu (Boussetta i Vorobiev, 2014). Nadalje u usporedbi s drugim fizikalnim tretmanima koji se primjenjuju (pulsirajuće električno polje, mikrovalovi i ultrazvuk), visokonaponsko električno pražnjenje pokazalo je bolju razinu ekstrakcije polifenola komine grožđa (Boussetta, 2010). Na učinkovitost ekstrakcije potpomognute HVED-om utječu mnogi procesni čimbenici: intenzitet električnog polja, brzina protoka, omjer tekućine i krutine, vrijeme tretmana te odabir otapala. Također, optimalne faktore procesa treba optimirati ovisno o ciljanim spojevima ekstrakcije te položaju tih spojeva u biljnom tkivu. Ukupno trajanje HVED tretmana (t_{HVED}) [2] i energetska unos HVEDa (w_{HVED}) [3] su parametri koje je potrebno pažljivo podesiti prilikom ekstrakcije HVED-om:

$$t_{HVED}(s) = n \times t_i \quad [2]$$

gdje je n broj izboja i t_i trajanje izboja (s).

$$w_{HVED} \left(\frac{kJ}{kg} \right) = \frac{E_p \times n}{m} \quad [3]$$

gdje je E_p energija jednog impulsa (kJ), n broj pražnjenja, a m masa suspenzije (kg) (Li i sur., 2019).

Postoje tri izvedbe HVED ekstrakcijskih sistema: šaržni, kontinuirani i cirkulacijski. Ovi sustavi rade po istom osnovnom mehanizmu, no na različiti način koncentriraju lokalno električno polje. Sustav za šaržnu ekstrakciju (slika 2) čini reaktor u kojemu su smještene dvije elektrode različite konfiguracije na određenoj udaljenosti. Jedna elektroda je spojena na vanjski izvor napona i ima oblik igle te je pozitivno nabijena, a druga je u obliku diska. Kontinuirani sustav predviđen je za industrijsku primjenu HVED ekstrakcije. Razvijena su dva tipa kontinuiranog sustava: konvergirani i prstenasti. Razlikuju se prema tipu elektroda: konvergirani sustav sastoji se od dvije mrežaste elektrode od nehrđajućeg čelika promjera 20 mm, a prstenasti sustav čine dvije prstenaste elektrode debljine 0,25 mm.

Cirkulcijski sistem je dizajniran tako da veći kapacitet zaprimanja uzoraka što povećava efikasnosti te smanjuje potrošnju energije. U reaktoru je smještena prstenasta elektroda u čijem je središtu vrh igle druge elektrode. Apliciranjem visokog napona na iglu, intenzitet lokalnog električnog polja u centru prstena je vrlo visok te se generira visokonaponsko električno pražnjenje (Li i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

3.1.1. Uzorak

U ovom istraživanju korišteni su osušeni listovi šećerne repe (*Beta vulgaris* subsp. *Vulgaris* var. *Altissima*) dobavljeni iz Turske. Listovi su usitnjeni u mlincu radi lakšeg provođenja ekstrakcije potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem. Uzorci su pripremljeni tako što se 1,0000 g suhog lista šećerne repe pomiješao s 50 mL deionizirane vode.

3.1.2. Aparatura i pribor

3.1.2.1. Aparatura:

- Analitička vaga NBL-254i Nimbus (Adam Equipment Inc., Oxford, SAD)
- Centrifuga 5430 (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- pH-EC metar HI5521-02 (Hanna Instruments Inc., Zagreb, Hrvatska) HI5522
- mlinac za mljevenje, Grindomix GM 300 – RETSCH, Retsch GmbH, Haan, Njemačka
- generator hladne plazme, IMP-SSPG-1200, Impel grupa, Zagreb, Hrvatska
- UV-VIS Spektrofotometar UV-2600i s opcijском ISR2600Plus integrirajućom sferom i programskom podrškom LabSolutions UV-Vis (Shimadzu, Kyoto, Japan)
- Vakuum pumpa Rocker 300 (Witeg, Wertheim, Njemačka)
- Vortex uređaj MX-S (Dlab, Peking, Kina)
- Ultrazvučna kupelj DT 100 H s grijanjem (Bandelin, Berlin, Njemačka)

3.1.2.2. Pribor

- kvarcne kivete
- mikropipete, volumena 200 μ L i 1000 μ L, 5 mL
- falkonice od 50 mL
- menzura volumena 100 mL
- staklene čaše (100 mL)
- termometar

- plastična lađica za vaganje
- stalak za epruvete
- staklene epruvete
- staklene pipete (1 i 5 mL)
- propipeta
- stakleni lijevak
- štoperica
- Büchnerov lijevak
- odsisna boca
- filter papir

3.1.3. Kemikalije i reagensi

Sve korištene kemikalije i reagensi bili su visoke analitičke čistoće.

Otapalo:

- deionizirana voda (PBF, Zagreb, Hrvatska)

Za određivanje ukupnih fenola:

- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Priprema: Komercijalni Folin-Ciocalteu reagens potrebno je razrijediti deioniziranom vodom u omjeru 1:2.

- otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

Priprema: u 160 mL vruće destilirane vode otopi se 40 g bezvodnog natrijeva karbonata, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjerne tikvici od 200 mL i nakon 24 h filtrira.

- standard galne kiseline (Acros Organics, New Jersey, USA)

Za određivanje ukupnih proteina metodom po Lowry-u:

- 0,1 M otopina natrijeva hidroksida (NaOH)

Priprema: odvagati 0,8000 g natrijeva hidroksida i kvantitativno, uz pomoć lijevka, prenijeti u odmjernu tikvicu od 200 mL. Nadopuniti odmjernu tikvicu do oznake deioniziranom vodom i promiješati.

- Reagens A: 2 % Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH

Priprema: odvagati 4,0000 g bezvodnog natrijeva karbonata, kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 200 mL te nadopuniti tikvicu do oznake prethodno pripremljenom 0,1 M otopinom natrijeva hidroksida i promiješati.

- 1 %-tna otopina K-Na-tartarata

Priprema: odvagati 0,0800 g K-Na-tartarata i kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 10 mL. Nadopuniti odmjernu tikvicu do oznake deioniziranom vodom i promiješati.

- Reagens B: 0,5 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ u 1 % K-Na-tartaratu

Priprema: odvagati 0,0400 g bakrova (II) sulfata pentrahidrata, kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 200 mL te nadopuniti tikvicu do oznake prethodno pripremljenom otopinom K-Na-tartarata i promiješati.

- Reagens C

Priprema: reagens C se dobiva miješanjem reagensa B i reagensa A u omjeru 1:50. U staklenu laboratorijsku bocu od 500 mL otpipetirati 350 mL reagensa A i 7 mL reagensa B te promiješati.

- Standard goveđeg serumskog albumina (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

3.2. Metode rada

Eksperimentalni dio proveden je u četiri djela:

1. Ekstrakcija sekundarnih biljnih metabolita i proteina lista šećerne repe, potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem
2. Toplinska ekstrakcija sekundarnih biljnih metabolita i proteina lista šećerne repe
3. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ukupnih fenola, proteina, pH i električne vodljivosti ekstrakata

4. Statistička obrada podataka u računalnom programima STATGRAPHICS Centurion i Microsoft Excel 365

3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem

Ekstrakcija ukupnih fenola i proteina iz suhog lista šećerne repe provedena je primjenom hladne plazme argona i dušika na uređaju za visokonaponsko električno pražnjenje-plazma (IMP-SSPG-1200; Impel grupa, Zagreb, Hrvatska). Kao otapalo pri ekstrakciji korištena je deionizirana voda. Tretman je proveden pri različitim vrijednostima napona (20 kV i 25 kV) i vremenima tretiranja od 3, 6 i 9 min uz frekvenciju 100 Hz (tablica 2 i 3).

Označavanje uzoraka:

Za tretman suhog lista plazmom argona, pripremljeno je 6 uzoraka označenih kraticom LHA te im je pridodana brojčana oznaka (1-6) prema redu tretiranja (tablica 2). Za tretman lista plazmom dušika, pripremljeno je također 6 uzoraka, označenih kraticom LHN te im je pridodana brojčana oznaka (1-6) (tablica 3).

Konvencionalna toplinska ekstrakcija korištena je kao kontrolna metoda te je provedena kako bi se usporedila učinkovitost HVED ekstrakcije. Provedena je u istom otapalu (deionizirana voda) te istom vremenu tretiranja (3, 6, 9 min). Uzorci koji su tretirani toplinskom ekstrakcijom u kupelji pri 60 °C označeni su kraticom LD0 te im je pridodana brojčana oznaka /3, /6, ili /9 s obzirom na vrijeme toplinskog tretmana u minutama.

Tablica 2. Prikaz parametara tretiranja uzoraka lista šećerne repe hladnom plazmom argona

UZORAK	NAPON (kV)	VRIJEME TRETIRANJA (min)	MASA (g)
LHA1	25	6	1,0006
LHA2	20	6	1,0004
LHA3	20	9	1,0009
LHA4	25	9	1,0008
LHA5	20	3	1,0001
LHA6	25	3	1,0002

Tablica 3. Prikaz parametara tretiranja uzoraka lista šećerne repe hladnom plazmom dušika

UZORAK	NAPON (kV)	VRIJEME TRETIRANJA (min)	MASA (g)
LHN1	25	6	1,0005
LHN2	20	6	0,9994
LHN3	20	9	1,0009
LHN4	25	9	1,0002
LHN5	20	3	1,0009
LHN6	25	3	1,001

Postupak ekstrakcije:

U plastičnu lađicu izvavano je 1 g ($\pm 0,001$ g) samljevenog suhog uzorka lista šećerne repe te su uzorci preneseni u stakleni reaktor volumena 100 mL, u koju je menzurom dodano 50 mL deionizirane vode. HVED ekstrakcija izvedena je šaržno pomoću generatora IMP-SSPG-1200 (slika 3) koji stvara visoki napon, a ionizacijom plina (argona ili dušika) nastaje hladna atmosferska plazma u uzorku. Reaktor za provedbu ekstrakcije, ima otvore, načinjene od silikonskog materijala koji omogućuju jednostavnu montažu elektrode na vrhu i igle na dnu reaktora. Kroz iglu je u sustav upuhivan plin protokom od 0,75 L/min koji je ioniziran pri naponu od 20 ili 25 kV.

Tehnički parametri plazma generatora (slika 3) IMP-SSPG-1200:

- podesivost napona istosmjerne struje u području od 1 kV do 30 kV
- podesivost maksimalne istosmjerne struje 40 mA (30 kV)
- generiranje pravokutnih impulsa (čvrsto stanje) iz visokog napona istosmjerne struje (max. 100 kHz)
- industrijski komunikacijski standardi RS485 MODBUS za proširivost prema vanjskim uređajima (analogni i digitalni I/O modul, senzori, pretvarači)
- TCP/IP s web serverom za daljinsko upravljanje i parametriziranje
- napajanje 230 V, 50 Hz – gradska mreža
- ambijentalna temperatura od 5 °C do 40 °C, ambijentalna vlažnost od 10 % do 90 %
- forsirano zračno hlađenje

Ekstrakti dobiveni HVED tretmanom, filtrirani su preko Büchnerovog lijevka u odsisnu bocu te je sakupljeni filtrat prebačen u falcon epruvete za daljnje analize spektrofotometrijskog određivanja ukupnih proteina i ukupnih fenola.



Slika 3. HVED i plazma generator IMP-SSPG-1200 (Impel grupa, Zagreb, Hrvatska)

3.2.2 Toplinska ekstrakcija

Toplinska ekstrakcija proteina i sekundarnih biljnih metabolita suhog lista šećerne repe, provedena je upotrebom ultrazvučne kupelji DT 100 H (35 kHz). U laboratorijske čaše od 250 mL odvagano je $2 \pm 0,1000$ g uzorka suhog lista šećerne repe te je dodano 100 mL deionizirane vode. Čaše su postavljene u kupelj te je nakon dostignute temperature od 60 °C mjereno vrijeme. Uzorci su na zadanoj temperaturi ekstrahirani 3, 6 i 9 minuta nakon čega su filtrirani preko Büchnerovog lijevka. Sakupljeni filtrat prebačen je u falcon epruvete za daljnju analizu.

3.2.3. Određivanje udjela ukupnih fenola

Metoda određivanja ukupnih fenola temelji se na kolorimetrijskoj reakciji. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline. Ovaj reagens oksidira fenoksid ion iz uzorka te se pritom reducira do plavo obojenih molibdenovih i volframovih oksida. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektrofotometrijski, na 765 nm, dva sata nakon početka reakcije. Intenzitet plavog obojenja direktno je proporcionalan udjelu polifenola u uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

3.2.3.1. Postupak određivanja ukupnih fenola

U staklenu epruvetu otpipetirano je redom 7,9 mL deionizirane vode, 0,1 mL uzorka, 0,5 mL Folin – Ciocaliteau reagens (razrijeđenog s vodom u omjeru 1:2) te 1,5 mL 20 %-tne otopine Na_2CO_3 . Tako pripremljeni uzorci pomiješani su vortex uređajem te ostavljeni 2 sata na sobnoj temperaturi bez prisustva svjetlosti nakon čega im je izmjerena apsorbanacija plavog obojenja na 765 nm.

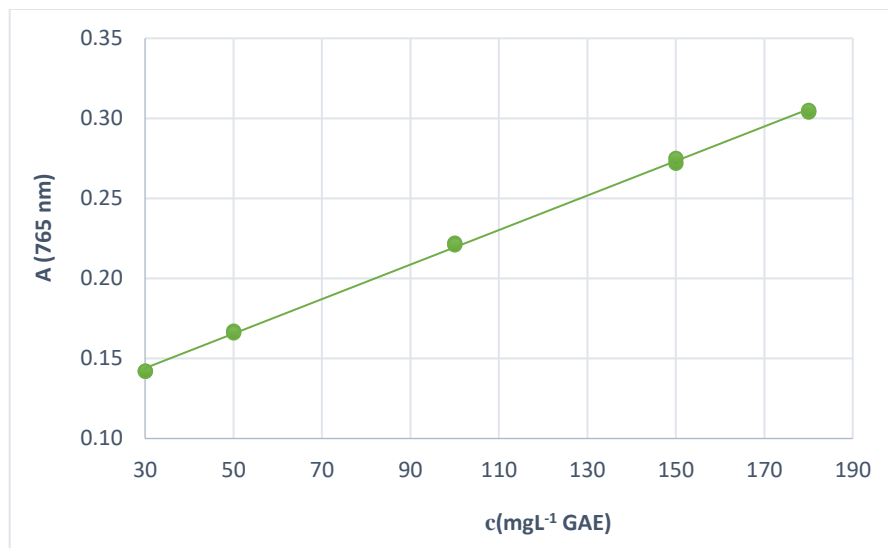
Slijepa proba je pripremljena na isti način kao i uzorci, jedino je umjesto uzorka u epruvetu dodano 0,1 mL deionizirane vode.

3.2.3.2. Izrada baždarenog dijagrama za određivanje ukupnih fenola

Za baždarni pravac ovisnosti apsorbanacije uzoraka o koncentraciji, treba iz osnovne otopine standarda galne kiseline koncentracije 1000 mg/L pripremiti razrjeđenja od 30, 50, 100, 150, 180 mg/L. Prethodno opisani postupak pripreme uzorka se ponavlja s razlikom da se u reakcijsku smjesu dodaje 0,1 mL pripremljenih razrijeđenih otopina galne kiseline. Apsorbancija uzorka izmjerena je spektrofotometrijski na valnoj duljini od 765 nm. Baždarni dijagram konstruiran je pomoću programa LabSolutions UV-Vis (slika 4) pri čemu su na apscisi nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbanacije. Koncentracija ukupnih fenola izračunata je dobivenom jednadžbom pravca:

$$y = 0,00107826x + 0,111618 \quad (R^2 = 0,99929) \quad [4]$$

gdje y predstavlja apsorbanaciju pri 765 nm, x koncentraciju galne kiseline (mg/L) i R^2 koeficijent determinacije. Koncentracija ukupnih fenola (mg/L GAE) u konačnici je izražena s obzirom na udio suhe tvari (mg /g_{s.tv.}) u listovima šećerne repe.



Slika 4. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

3.2.4. Određivanje ukupnih proteina metodom po Lowry-u

Metoda po Lowry-u je kolorimetrijska metoda kojom se određuje koncentracija proteina u otopini.

Temelji se na dvije reakcije:

1. tvorbi kompleksa iona bakra s peptidnim vezama (u alkalnim uvjetima Cu^{2+} formira kompleks s peptidnim vezama i pritom se reducira u Cu^+)
2. redukciji Folin-Ciocalteu reagensa koji u reakciji sa aminokiselinskim ostacima tirozina, triptofana i cisteina tvori nestabilni produkt koji se zatim reducira do volfram i molibden okside.

Reakcijama se razvija plavo obojenje otopine koje je proporcionalno apsorbanciji te se mjeri na valnoj duljini od 740 nm. (Waterborg i Matthews, 1984).

3.2.4.1. Postupak određivanja koncentracije ukupnih proteina

Prije postavljanja reakcije potrebno je pripremiti uzorke. Filtrati uzoraka su stavljeni u centrifugu 20 minuta na 7830 o/min nakon čega su razrijeđeni s vodom 10 puta. Razrijeđenije je nužno kako bi apsorbancija bila u linearnom području od 0-1. U staklene epruvete otpipetirano je

0,8 mL uzorka i 4 ml reagensa C te su komponente pomiješane vortexom. Nakon 10-15 minuta u epruvete je naglo, uz miješanje, dodano 0,4 mL prethodno razrijeđenog Folin-Ciocalteau reagensa. Slijepa proba je pripremljena na isti način s razlikom da je umjesto uzorka, u epruvetu dodana ista količina deionizirane vode. Pripremljeni uzorci postavljeni su 40-60 minuta u zamračeni prostor kako bi došlo do kolorimetrijske reakcije, odnosno razvitka plavog obojenja. Apsorbancija uzoraka, pri valnoj duljini 740 nm, mjerena je na UV-VIS spektrofotometru UV-2600i, uz programskom podršku LabSolutions UV-Vis software-a.

3.2.4.2. Izrada baždarenog dijagrama za određivanje koncentracije ukupnih proteina

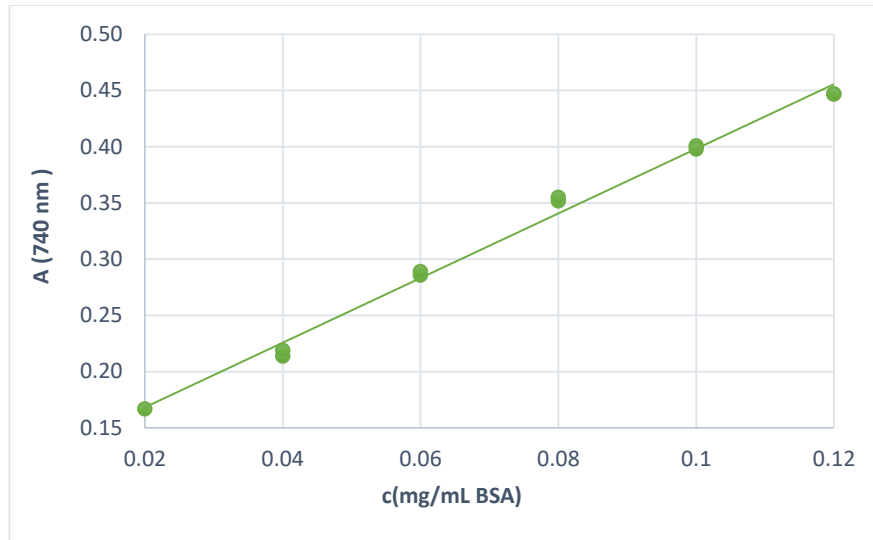
Za određivanje nepoznate koncentracije ukupnih proteina u uzorku treba konstruirati baždarni dijagram ovisnosti izmjerene apsorbancije o poznatoj koncentraciji standarda goveđeg serumskog albumina (engl. *Bovine serum albumin*, BSA).

3.2.4.3. Izrada baždarenog dijagrama za određivanje ukupnih proteina

Za baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije uzoraka o koncentraciji ukupnih proteina, treba iz osnovne otopine standarda goveđeg serumskog albumina (engl. *Bovine serum albumin*, BSA) koncentracije 200 mg/L pripremiti otopine poznate koncentracije: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10 i 0,12 mg/mL. Prethodno opisani postupak pripreme uzorka se ponavlja s razlikom da se u reakcijsku smjesu dodaje 0,8 mL pripremljenih otopina poznatih koncentracija BSA. Apsorbancija uzoraka izmjerena je spektrofotometrijski na valnoj duljini od 740 nm. Baždarni dijagram konstruiran je u programu LabSolutions UV-Vis (slika 5) pri čemu su na apscisi nanesene koncentracije BSA(mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije. Koncentracija ukupnih proteina izračunata je dobivenom jednadžbom pravca:

$$y = 2,87376x + 0,110804 \quad (R^2 = 0,99235) \quad [5]$$

gdje y predstavlja apsorbanciju pri 740 nm, x koncentraciju proteina (mg/L) i R^2 koeficijent determinacije. Koncentracija ukupnih proteina (mg/L) u konačnici je izražena s obzirom na udio suhe tvari (mg /g_{s.tv.}) u listovima šećerne repe.



Slika 5. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA

3.2.5. Određivanje pH vrijednosti

Mjerenje pH vrijednosti u uzorcima provedeno je očitavanjem vrijednosti na pH – EC metru HI5521-02 (Hanna Instruments Inc., Zagreb, Hrvatska). Elektroda je uronjena u uzorak te se pH-vrijednost očitala nakon stabilizacije na ekranu uređaja.

3.2.6. Određivanje električne vodljivosti

Električna vodljivost (mS/cm) uzorka mjerena je pH – EC metrom HI5521-02 (Hanna Instruments Inc., Zagreb, Hrvatska). Elektroda je uronjena u uzorak te je vrijednost na ekranu očitana nakon stabilizacije.

3.2.7. Određivanje suhe tvari sušenjem do konstantne mase

Suha tvar određena je sušenjem uzorka u testnoj komori na 105 °C, do konstantne mase. Određivanje suhe tvari sušenjem do konstantne mase temelji se na uklanjanju vode iz uzorka evaporacijom te se razlikom u masi uzorka prije i nakon sušenja uzorka, izračunava udio suhe tvari, prema jednadžbi:

$$\text{suha tvar } [\%] = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100 \quad [6]$$

* m_0 -masa prazne posudice, m_1 -masa posudice s uzorkom prije sušenja, m_2 -masa posudice s uzorkom nakon sušenja.

3.2.7.1. Postupak određivanja suhe tvari sušenjem do konstantne mase

Staklene posudice treba osušiti u testnoj komori na 105 °C te ohladiti u eksikatoru. Osušenim i ohlađenim posudicama odredi se masa s točnošću od $\pm 0,0002$ g. U posudice izvaže se 2,5 g uzorka i stavi u testnu komoru na $105^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ sat vremena. Posudice s uzorkom potrebno je nakon završenog sušenja, ohladiti u eksikatoru te izvagati. Postupak sušenja, hlađenja i vaganja posudica s uzorcima, ponavlja se sve dok razlika dva uzastopna sušenja, u razmaku od pola sata, nije manja od 0,001 g. Udio suhe tvari uzorka suhog lista šećerne repe je 94,49 % (izračunato prema jednadžbi [6]; $m_0 = 37,1782$ g, $m_1 = 39,6784$ g, $m_2 = 39,5407$ g).

3.2.8. Statistička obrada podataka

Za obradu podataka, dizajn eksperimenta i optimizaciju parametara HVED ekstrakcije, korišten je program STATGRAPHICS Centurion. Za utvrđivanje potencijalnih utjecaja ulaznih (nezavisnih varijabli) na izlazne (zavisne varijable), primijenjen je faktorijalni dizajn s više razina utjecaja (*Multilevel Factorial Design*). Ulazne varijable eksperimenta su: napon (20 i 25 kV) i vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 minuta). Izlazne varijable su udjeli ukupnih proteina (mg /g_{s.tv.}), udjeli ukupnih fenola (mg/g_{s.tv.}), pH i električna vodljivost (mS/cm). Obradom podataka u programu, napravljeni su Pareto dijagrami koji grafički prikazuju statističku značajnost napona i vremena tretiranja (ulaznih parametra) na ukupne proteine, ukupne fenole, pH i električnu vodljivost. Također, provedene su analize varijanci za ukupne proteine, ukupne fenole, pH i električnu vodljivost, a parametri imaju statistički značajan utjecaj ako je $p < 0,05$ (značajno se razlikuju od nule u intervalu pouzdanosti od 95,0 %). Određene su i jednadžba regresije za izlazne varijable

koje opisuju ponašanje polinoma dobivenog obradom rezultata ovisno o naponu i vremenu tretiranja. Dijagram odzivne površine omogućuje zapažanje odgovora uslijed promjena u eksperimentalnim parametrima te daje predviđanja za buduća istraživanja. Optimizacijom uvjeta određen je napon i vrijeme tretiranja za postizanje maksimalnih izlaznih vrijednosti ukupnih proteina i fenola, pH i električne vodljivosti.

Za obradu rezultata toplinskih ekstrakcija korišten je program Microsoft Excel 365. Pomoću ANOVA testa analize varijance, određena je statistička značajnost utjecaja vremena tretiranja (3, 6 i 9 min) na izlazne vrijednosti ukupnih proteina, ukupnih fenola, pH i električne vodljivosti, uz interval pouzdanosti od 95,0 %.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju, ispitan je utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja (HVED ekstrakcije) na prinos ukupnih proteina i ukupnih fenola iz suhog lista šećerne repe. HVED-om je tretirano ukupno 12 uzoraka (6 plazmom dušika i 6 plazmom argona) u vremenskom periodu od 3, 6 i 9 minuta, a plazma je generirana pri 20 i 25 kV. Tijekom ove ekstrakcije ne dolazi do povišenja temperature u sustavu, čime je izbjegnuta degradacija termolabilnih spojeva. Provedena je i toplinska ekstrakcija u trajanju 3, 6 i 9 minuta pri 60 °C kako bi se usporedila učinkovitost HVED ekstrakcije.

Koncentracije ukupnih proteina i ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima, određivane su spektrofotometrijski, pri čemu su apsorbancije mjerene na 740 nm (za ukupne proteine) i 765 nm (za ukupne fenole). Rezultati dobivenih koncentracija, izraženi su s obzirom na suhu tvar uzorka lista šećerne repe te su prikazani u tablicama kao srednja vrijednost dva paralelna mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom. U tablicama su također navedene pH vrijednosti i električne vodljivosti ekstrakata.

Za rezultate HVED-ekstrakcija, provedena je statistička analiza u programu STATGRAPHIC Centurion. Za utvrđivanje potencijalnih utjecaja ulaznih varijabli (napon i vrijeme tretiranja) na izlazne (prinos ukupnih fenola i ukupnih proteina, pH i električna vodljivost), primijenjen je faktorijalni dizajn s više razina utjecaja. Rezultati statističke analize prikazani su u obliku Pareto dijagrama, MANOVA tablica, jednadžbe regresije, dijagrama odzivne površine i tablice optimalnih vrijednosti.

Za statističku obradu rezultata toplinskih ekstrakcija korišten je program Microsoft Excel 365 u kojem je ANOVA testom određena statistička značajnost utjecaja vremena tretiranja na izlazne vrijednosti ukupnih proteina, ukupnih fenola, pH i električne vodljivosti.

4.1. Rezultati parametara dobivenih nakon HVED ekstrakcije

U tablici 4 prikazani su rezultati mjerenja ukupnih proteina i fenola, pH vrijednosti i električna vodljivosti uzoraka LHN nakon provedene HVED ekstrakcije. pH vrijednost uzorka prije tretmana je 6,678. Nakon tretmana, vrijednosti pH su u rasponu 6,602 (LHN1) do 6,678 (LHN5). Izmjerena vrijednost električne vodljivost uzorka prije tretmana iznosila je 5,146 mS/cm dok su vrijednosti nakon tretmana u rasponu od 3,593 mS/cm (LHN3) do 3,738 mS/cm (LHN2). Izmjerene vrijednosti ukupnih proteina, izražene s obzirom na suhu tvar lista, su u rasponu od $76,7277 \pm 1,22$ do $85,6704 \pm 2,38$ mg/g_{s.tv.}. Izmjereni udio ukupnih fenola u uzorcima je u rasponu od $12,1159 \pm 0,52$ do $14,0052 \pm 0,00$ mg/g_{s.tv.}. Najviši prinosi ukupnih fenola i proteina izmjereni su kod uzorka LHN4 koji je tretiran 9 minuta pri naponu od 25 kV.

Tablica 4. Rezultati mjerenja ukupnih proteina i fenola, pH vrijednosti i električne vodljivosti za uzorke LHN

UZORAK	t (min)	U (kV)	pH	G (mS/cm)	UP (mg/g _{s.tv.})	UF(mg/g _{s.tv.})
LHN1	6	25	6,602	3,678	81, 1462 ± 0,66	13,1219 ± 0,15
LHN2	6	20	6,625	3,738	81,0404 ± 1,30	12,6311 ± 0,15
LHN3	9	20	6,632	3,593	81,2256 ± 2,22	12,4839 ± 0,39
LHN4	9	25	6,612	3,694	85,6704 ± 2,38	14,0052 ± 0,00
LHN5	3	20	6,678	3,657	77,5479 ± 0,56	12,1159 ± 0,52
LHN6	3	25	6,636	3,607	76,7277 ± 1,22	12,5330 ± 0,05

* t-vrijeme tretmana; U- napon; G-električna vodljivost; UP-ukupni proteini; UF-ukupni fenoli

*Rezultati UP I UF izraženi su kao srednja vrijednost dviju paralela ± standardna devijacija, a udio suhe tvari uzorka je 94,49 %

U tablici 5 prikazani su rezultati mjerenja ukupnih proteina i fenola, pH vrijednosti i električna vodljivosti uzoraka LHA nakon provedene HVED ekstrakcije. Izmjerena pH vrijednost uzorka prije tretmana iznosila je 6,678. Nakon tretmana, vrijednosti pH su u rasponu 6,603 do 6,658. Izmjerena vrijednost električne vodljivost uzorka prije tretmana iznosila je 5,146 mS/cm dok su vrijednosti nakon tretmana u rasponu od 3,533 mS/cm do 3,738 mS/cm. Izmjerene vrijednosti ukupnih proteina izražene s obzirom na suhu tvar lista, su u rasponu od $73,6851 \pm 0,19$ do $85,2736 \pm 0,56$ mg/g_{s.tv.}. Izmjereni udio ukupnih fenola u uzorcima je u rasponu od $12,0667 \pm 0,27$ do $13,7108 \pm 0,1$ mg/g_{s.tv.}. Najviši prinos ukupnih proteina, izmjerena je kod uzorka LHA1, koji je podvrgnut tretmanu HVED-om u trajanju 6 minuta i naponu od 25 kV. Najviši prinos ukupnih fenola izmjerena je kod uzorka LHA4 koji je tretiran 9 min pri naponu 25 kV.

Tablica 5. Rezultati mjerenja ukupnih proteina i fenola, pH vrijednosti i električne vodljivosti za uzorak LHA

UZORAK	t (min)	U (kV)	pH	G (mS/cm)	UP(mg/g _{s.tv.})	UF(mg/g _{s.tv.})
LHA1	6	25	6,658	3,678	$85,2736 \pm 0,56$	$13,3182 \pm 0,15$
LHA2	6	20	6,625	3,738	$81,0890 \pm 1,71$	$12,6387 \pm 0,09$
LHA3	9	20	6,571	3,710	$82,7336 \pm 0,19$	$13,4408 \pm 0,12$
LHA4	9	25	6,611	3,690	$85,0090 \pm 0,29$	$13,7108 \pm 0,10$
LHA5	3	20	6,621	3,633	$79,3206 \pm 1,01$	$12,8274 \pm 0,39$
LHA6	3	25	6,603	3,533	$73,6851 \pm 0,19$	$12,0667 \pm 0,27$

* t-vrijeme tretmana; U- napon; G-električna vodljivost; UP-ukupni proteini; UF-ukupni fenoli

*Rezultati UP I UF izraženi su kao srednja vrijednost dviju paralela \pm standardna devijacija, a udio suhe tvari uzorka je 94,49 %

4.2. Rezultati ispitivanih svojstava nakon toplinske ekstrakcije

U tablici 6 prikazani su rezultati mjerenja ukupnih proteina i fenola, pH vrijednosti i električna vodljivosti uzoraka LD0 nakon provedene toplinske ekstrakcije. Izmjerena pH vrijednost uzorka prije tretmana iznosila je 6,707. Nakon tretmana, vrijednosti pH su u rasponu 6,870 do 6,898. Izmjerena vrijednost električne vodljivost uzorka prije tretmana iznosila je 5,160 mS/cm dok su vrijednosti nakon tretmana u rasponu od 4,104 mS/cm do 5,113 mS/cm. Izmjerene vrijednosti ukupnih proteina izražen s obzirom na suhu tvar listova šećerne repe su u rasponu od $65,5096 \pm 1,01$ do $74,1613 \pm 1,56$ mg/g_{s.tv.}. Izmjereni udio ukupnih fenola u uzorcima je u rasponu od $11,8435 \pm 0,1$ do $14,1036 \pm 0,15$ mg/g_{s.tv.}.

Prinosi ukupnih proteina i fenola se smanjuju u korelaciji s produljenjem trajanja tretmana, pa se tako najviše vrijednosti ukupnih proteina zabilježene kod uzorka LD0/3, a najniže kod uzorka LD0/9. pH vrijednost uzoraka je neovisna o duljini toplinskog tretmana dok vrijednost izmjerene električne provodnosti blago opadaju u korelaciji s produljenjem trajanja toplinskog tretmana.

Tablica 6. Rezultati mjerenja ukupnih proteina i polifenola, pH vrijednosti i električne vodljivosti za uzorak LD0

UZORAK	t (min)	pH	G (mS/cm)	UP (mg /g _{s.tv.})	UF (mg /g _{s.tv.})
LD0/3	3	6,870	5,113	$74,1613 \pm 1,56$	$14,1036 \pm 0,15$
LD0/6	6	6,898	5,073	$73,9496 \pm 1,93$	$13,9071 \pm 0,1$
LD0/9	9	6,880	4,104	$65,5096 \pm 1,01$	$11,8435 \pm 0,1$

* t-vrijeme tretmana; U- napon; G-električna vodljivost; UP-ukupni proteini; UF-ukupni fenoli

*Rezultati UP I UF izraženi su kao srednja vrijednost dviju paralela \pm standardna devijacija, a udio suhe tvari uzorka je 94,49 %

4.3. Usporedba rezultata provedenih ekstrakcija

4.3.1. Ukupni proteini

Ekstrakti tretiranim HVED-om, imaju veći prinos ukupnih proteina u odnosu na uzorke podvrgnute toplinskim tretmanu. Produljenje trajanja toplinskog tretmana rezultira padom prinosa proteina; uzorku tretiranom na 60 °C 3 min (LD0/3), izmjeren veći udio proteina u usporedbi s uzorkom tretiranim 9 minuta (LD0/9). Proteini su termolabilni te na povišenim temperaturama podliježu agregaciji i denaturaciji. Posljedično, dolazi do pada prinosa i negativnog utjecaja na njihove funkcionalne karakteristike (Kiskini i sur., 2017).

Najviši prinos proteina izmjeren je kod uzorka LHN4 ($85,6704 \pm 2,38$ mg/g_{s.tv}; uvjeti tretmana: 9 min i 25 kV). Ovakav rezultat je posljedica elektroporacije biljnog materijala (Boussetta i Vorobiev, 2014), što je dovelo do bolje ekstrakcije proteina u usporedbi s uzorcima koji su tretirani kraće vrijeme i s manjim naponom. Uzorku LHA4, tretiranom pod istim uvjetima kao LHN4, uz razliku radnog plina (argon), izmjeren je nešto manji prinos proteina.

Najveći prinos proteina, uzimajući u obzir samo uzorke tretirane strujom argona, imao je uzorak LHA1 (uvjeti tretmana 6 min i 25 kV). Usporedbom ostalih rezultata prinosa UP u tablicama 4 i 5, ne može se sa sigurnošću zaključiti koji je radni plin pokazao bolji performans u ekstrakciji proteina iz lista šećerne repe te je iz tog razloga, potrebno provođenje daljnjih istraživanja problematike.

Prema literaturnim podacima, list šećerne repe u suhoj tvari sadrži $24,02 \pm 0,18$ % proteina (Akyüz i Ersus, 2022) a, prema istraživanjima Tenorio i sur. (2017), sadrži $15,5 \pm 1,7$ %. Nadalje Lammens i sur. (2012) utvrdili su udio proteina od 22,8 %. Ovakva varijacija udjela proteina u provedenim studijama rezultat je razlike u fitokemijskoj kompoziciji uzoraka koja varira ovisno o sorti, vremenu berbe, geografskom podrijetlu, klimi, karakteristikama tla, uvjetima rasta (plastenik, polje) te primijenjenim gnojivima (Kiskini i sur. 2016). Također u studijama su korištene različite metode za određivanje proteina što dovodi do razlike u rezultatima. Ekstrakciju proteina može otežati čvrsta stanična stijenka (Rommi i sur., 2014) te u njoj prisutni pektini te fenolni spojevi (Prigent i sur., 2007). Nadalje, kinoni nastali djelovanjem polifenol oksidaze, mogu kovalentnim vezanjem na proteine nepogodno utjecati na njihovu ekstrakciju (Prigent i sur., 2007).

Usporedbom dobivenih rezultata (prinos proteina ~8 % u suhoj tvari) s literaturnim podacima možemo se zaključiti da je HVED-om potpomognuta ekstrakcija nije najučinkovitija metoda za ekstrakciju proteina iz suhog lišća šećerne repe, no isto tako pokazuje bolje rezultate u odnosu na konvencionalnu toplinsku ekstrakciju.

4.3.2. Ukupni fenoli

Najviši izmjereni prinos ukupnih fenola (UF) zabilježen je kod uzorka LD0/3 koji je toplinski tretiran 3 minute na 60 °C. Uzorak tretiran pri istoj temperaturi 6 minuta, imao je nešto manji prinos fenola dok je kod uzorka tretiranog 9 minuta izmjerena najniži prinos fenola s obzirom na sve tretirane uzorke. Fenolni spojevi su termolabilni (Antony i Farid, 2022). Stupanj njihove termalne degradacije ovisi o više faktora: primijenjenom ekstrakcijskom tretmanu, korištenom otapalu, vremenu trajanja zagrijavanja, ekstrakcijskom okolišu, tipu uzorka, uvjetima čuvanja koji prethode ekstrakciji i izloženosti kisiku (Antony i Farid, 2022). Millard i Berset (1995) proučavali su ponašanje polifenola na visokim temperaturama te su utvrdili da se ne topljivi fenolni spojevi oslobađaju kidanjem veza između lignina i fenolnih kiselina. Nadalje, lignini se razgrađuju pri visokim temperaturama te dolazi do porasta prinosa fenolnih kiselina. Slijedi pad prinosa polifenola tijekom ekstrakcije na visokoj temperaturi zbog njihove degradacije. Primjenom konvencionalnih metoda ekstrakcije (ekstrakcija otapalima, Soxhlet ekstrakcija, maceracija), najviši prinosi UF zabilježeni su na temperaturama od 60-80 °C. Na temperaturama iznad 80 °C, prinos UF se smanjuje zbog degradacije uzrokovane povišenom temperaturom (Antony i Farid, 2022).

Prinos UF u svim HVED tretiranim uzorcima, niži je u usporedbi s toplinski tretiranim uzorcima LD0/3 i LD0/6.

Najveći prinos UF kod HVED tretiranih uzoraka, izmjeren je kod LHN4 koji je tretiran 9 minuta pri naponu od 25 kV. Uzorak tretiran pod istim uvjetima strujom argona, imao je za 0,2944 mg /g_{s.tv.} (2,1 %) manji prinos UF. Dakle, pri navedenim uvjetima, dušik se pokazao kao neznatno bolji radni plin. Međutim, na temelju dobivenih rezultata prikazanih u tablicama 4 i 5, ne možemo odrediti koji je radni plin pokazao bolji performans u ekstrakciji UF iz uzorka.

Dulje vrijeme i veći primijenjeni napon HVED tretmana, pozitivno utječu na prinos UF u ekstraktima, što je posljedica elektroporacije tretiranog uzorka (Li i sur., 2019) (Barišić i sur., 2020). Nutrizio i sur. (2020) proveli su istraživanje u kojem su uspoređivali komercijalnu i HVED ekstrakciju UF na listu ružmarina. Uzorci tretirani HVED-om pokazali su veći prinos UF. Struja dušika, duže vrijeme tretiranja i viši napon, rezultirali su boljim prinosom UF.

U usporedbi s proteinima, prinos fenola je niži što je posljedica ne topljivosti određenih fenolnih spojeva u korištenom otapalu vodi (Wink, 1997). Babbar i sur. (2014) proveli su istraživanje u kojem je uspoređivana topivost UF vegetabilnog otpada u različitim otapalima (metanolu, etil-acetatu, kloroformu i n-heksanu). Zaključili su da izbor ekstrakcijskog otapala, odnosno njegova polarnost, uvelike utječu na udio UF u ekstraktima.

4.3.3. pH

HVED tretman doveo je do neznatnog pada pH vrijednosti ekstrakata. U nekoliko studija ispitivan je utjecaj tretmana plazmom na pH hrane. Promjene pH pripisuju se interakciji plinova (argona i dušika) s prisutnom vodom. Kod tekućih namjernica, plazma ima veći utjecaj na promjenu pH nego što je to slučaj kod krutih namjernica gdje plazma utječe samo na površinski prisutnu vodu te je formiranje kiselih spojeva ograničeno samo na površinski dio namjernice (Pankaj i sur., 2018). Međutim, provedene su i studije u kojima nije zamijećen utjecaj tretmana plazme na pH namirnice. Ovakvi kontradiktorni rezultati ukazuju na to da učinci tretmana plazmom na pH ovise o više faktora (puferski kapacitet, fiziološka aktivnost tkiva, razina oštećenja membrane) (Pankaj i sur., 2018). Tijekom HVED tretmana, dolazi do oštećenja stanične membrane lista, djelovanjem udarnih valova. Posljedično dolazi do ekstrakcije staničnog sadržaja te promjene pH. U istraživanju kojeg su proveli Pankaj i sur. (2017) sok bijelog grožđa nije statistički značajno promijenio pH ($p > 0,05$) uslijed tretmana HVED-om u trajanju od 4 min. Pri 80 kV (pH smanjen za 0,08 jedinica). Promjena pH je, prema autoru, posljedica stvaranja hidroksilnih radikala nastalih uslijed električnog pražnjenja. U istraživanju kojega su proveli Dasan i Boyaci (2018) nisu zabilježene značajnije promjene pH vrijednosti u sokovima jabuke, naranče, višnje i rajčice nakon obrade plazmom uslijed HVED tretmana.

Toplinski tretman rezultirao je neznatno većom promjenom pH uzoraka u odnosu na HVED (povećanje za 0,2 jedinice). Nije uočena promjena pH s produljenjem trajanja toplinskog tretmana.

4.3.4. Električna vodljivost

Svi ekstrakti (LHA, LHN i LD0) pokazuju manju električnu vodljivost s obzirom na kontrolu. Električna vodljivost otopine ovisi o više faktora: koncentraciji i prirodi iona, temperaturi, prisutnosti nečistoća, pH vrijednost i karakteristikama otapala (viskoznost, dielektrična konstanta). Postoji više razloga zašto se vrijednost električne vodljivosti mijenja nakon tretmana visokonaponskim električnim pražnjenjem (Minea, 2019). Visokonaponsko električno pražnjenje može izazvati razgradnju nečistoća, što može smanjiti koncentraciju ionskih vrsta i smanjiti vodljivost otopine. Također dolazi do promjena pH vrijednost otopine, što može utjecati na vodljivost (Akiyama i Akiyama 2021).

Kod uzoraka tretiranih HVED-om došlo je do većeg smanjenja električne vodljivosti u odnosu na toplinski tretirane uzorke. Povećanje voltaže s 20 na 25 kV, rezultiralo je neznatnim smanjenjem vodljivosti većine uzoraka tretiranih u istom vremenskom razdoblju. Do najvećeg smanjenja električne vodljivosti došlo je kod uzorka LHA6 (3 min, 25 kV) i to za 1,6 za mS/cm. Kod uzorka LHN2 (6 min, 20 kV) došlo je do najmanje promjene električne vodljivosti (1,4 mS/cm s obzirom na kontrolu).

Pankaj i sur. (2017) tretirali su sok bijelog grožđa HVED-om pri čemu je također došlo do neznatnog smanjenja električne vodljivosti uzoraka tretiranih pri 80 kV u trajanju od 2 do 4 minute.

Uzorci koji su toplinski tretirani, imaju veću električnu vodljivost u odnosu na HVED- tretirane uzorke.

4.4. Rezultati statističke obrade podataka

4.4.1. Rezultati statističke obrade i optimiranja parametra za uzorak LHN

4.4.1.1. Statistička analiza ukupnih proteina

Iz Pareto dijagrama u prilogu 1, zaključuje se da napon i vrijeme tretiranja, njihove interakcije te kvadratna interakcija vremena tretiranja, nemaju statistički značajan utjecaj na prinos ukupnih proteina LHN uzoraka.

U prilogu 2 tablično su prikazani rezultati analize varijance za LHN uzorke. Primjenom ovakve analize moguće je odrediti varijabilnost prinosa ukupnih proteina s obzirom na svaki parametar. Također se testira statistička značajnost svakog parametra usporedbom srednjeg kvadrata s procijenim eksperimentalne pogreške. Niti jedan od parametara (napon, vrijeme tretiranja, interakcija napona i vremena tretiranja te kvadratna interakcija vremena tretiranja), nema p-vrijednost manju od 0,05 što znači da nisu statistički značajni. Koeficijent determinacije R^2 pokazuje da ovakav model objašnjava 97,8613 % varijabilnosti ukupnih proteina.

R^2 statistika, prilagođena za stupnjeve slobode, pogodnija je za usporedbu više nezavisnih varijabli iznosi 89,3065 %. Standardna pogreška procjene pokazuje standardnu devijaciju odstupanja koja iznosi 1,05091. Srednja apsolutna pogreška iznosi 0,404495 i predstavlja srednju vrijednost odstupanja.

Durbin-Watson (DW) statistika utvrđuje postoji li značajna korelacija redosljeda kojim se pojavljuju odstupanja te iznosi 3,08333.

Iz obrađenih rezultata dobivena je jednadžba regresije za ukupne proteine LHN uzoraka (prilog 3) te je pomoću iste moguće predvidjeti izlazne vrijednosti proteina tijekom dizajniranja eksperimenta.

Dijagram odzivne površine (prilog 4) omogućuje zapažanje odgovora uslijed promjena u eksperimentalnim parametrima te omogućava predviđanje za buduća istraživanja.

Optimalna vrijednost napona za postizanje maksimalnog prinosa ukupnih proteina je 25 kV, a optimalno vrijeme trajanja tretiranja je 9 minuta. Optimalna vrijednost udjela ukupnih proteina za LHA uzorke iznosi 85,3499 mg/g_{s.tv.}.

4.4.1.2. Statistička analiza ukupnih fenola

Iz Pareto dijagrama u prilogu 1, zaključuje se da napon i vrijeme tretiranja, njihove interakcije te kvadratna interakcija vremena tretiranja, nemaju statistički značajan utjecaj na prinos ukupnih fenola kod LHN uzoraka.

Rezultati analize varijance (prilog 2) LHN uzoraka za ukupne fenole, pokazuju da ulazni parametri, napon i vrijeme tretiranja kao i njihove međusobne interakcije, nemaju statistički značajan utjecaj na prinos ($p > 0,05$).

Optimalna vrijednost napona za postizanje maksimalnog prinosa ukupnih fenola je 25 kV, a optimalno vrijeme tretiranja je 9 minuta. Optimalna vrijednost udjela ukupnih fenola za LHA uzorke iznosi 13,9197 mg/g_{s.tv.}

4.4.1.3. Statistička analiza pH vrijednosti

Iz Pareto dijagrama u prilogu 1, zaključuje se da napon i vrijeme tretiranja, njihove interakcije te kvadratna interakcija vremena tretiranja, nemaju statistički značajan utjecaj na pH uzoraka LHN.

Rezultati analize varijance, pokazuju da ulazni parametri, napon i vrijeme tretiranja kao i njihove interakcije, nemaju statistički značajan utjecaj na prinos ($p > 0,05$).

Optimalna vrijednost pH je 6,67667, a postižu se kod napona od 25 kV i u vremenu tretiranja od 9 minuta.

4.4.1.4 Statistička analiza električne vodljivosti

Iz Pareto dijagrama u prilogu 1., zaključuje se da napon i vrijeme tretiranja, njihove interakcije te kvadratna interakcija vremena tretiranja, nemaju statistički značajan utjecaj na električnu vodljivost LHN uzoraka.

Rezultati analize varijance, LHN uzoraka za električnu vodljivost, pokazuju kako ulazni parametri, napon i vrijeme tretiranja kao i njihove interakcije, nemaju statistički značajan utjecaj ($p > 0,05$).

Optimalna vrijednost električne vodljivosti je 3,71314 mS/cm . Rezultati optimizacije pokazali su da je optimalna vrijednost napona, za postizanje maksimalne električne vodljivosti, 20 kV i vrijeme tretiranja od 5,31596 min.

4.4.2. Rezultati statističke obrade i optimiranja parametara za uzorak LHA

4.4.2.1. Statistička analiza ukupnih proteina

Iz Pareto dijagrama u prilogu 6, zaključuje se da napon i vrijeme tretiranja, njihove interakcije te kvadratna interakcija vremena tretiranja, nemaju statistički značajan utjecaj na prinos ukupnih proteina kod LHA uzoraka. U prilogu 7 tablično su prikazani rezultati analize varijance za LHA uzorke. Niti jedan parametara (napon, vrijeme tretiranja, interakcija napona i vremena tretiranja te kvadratna interakcija vremena tretiranja), nema p-vrijednost manju od 0,05 što znači da se značajno ne razlikuju od 0 na razini pouzdanosti od 95,0 %.

Koeficijent determinacije, R^2 pokazuje da ovakav model objašnjava 65,4712 % varijabilnosti ukupnih proteina.

Standardna pogreška procjene pokazuje standardnu devijaciju odstupanja koja iznosi 6,29467. Srednja apsolutna pogreška iznosi 2,42282 i predstavlja srednju vrijednost odstupanja.

Durbin-Watson (DW) statistika utvrđuje postoji li značajna korelacija redoslijeda kojim se pojavljuju odstupanja te je njena vrijednost 3,08333.

Iz obrađenih rezultata dobivena je jednadžba regresije za ukupne proteine kod LHA uzoraka (prilog 8) te je pomoću iste moguće predvidjeti izlazne vrijednosti proteina tijekom dizajniranja eksperimenta.

Dijagram odzivne površine (prilog 9) omogućuje zapažanje odgovora uslijed promjena u eksperimentalnim parametrima te omogućava predviđanje za buduća istraživanja. Unatoč tome što napon i vrijeme tretiranja nisu statistički značajni, na dijagramu se uočava njihov utjecaj na porast prinosa ukupnih proteina. Polinom optimizacije dobiven obradom rezultata za ukupne proteine kod LHA uzoraka nalazi se u prilogu 9.

Optimalna vrijednost napona za postizanje maksimalnog prinosa ukupnih proteina je 25 kV, a optimalno vrijeme trajanja tretiranja je 9 minuta. Optimalna vrijednost udjela ukupnih proteina za LHA uzorke iznosi 86,7582 mg/g_{s.tv.}.

4.4.2.2. Statistička analiza ukupnih fenola

Iz Pareto dijagrama u prilogu 6, zaključuje se kako napon i vrijeme tretiranja, njihove interakcije te kvadratna interakcija vremena tretiranja, nemaju statistički značajan utjecaj na prinos ukupnih fenola kod LHA uzoraka ($p > 0,05$). Unatoč tome što napon i vrijeme tretiranja nisu statistički značajni, na dijagramu odzivne površine, uočava se njihov utjecaj na porast prinosa ukupnih fenola. Polinom optimizacije dobiven obradom rezultata za ukupne proteine LHA uzoraka nalazi se u prilogu 9.

Optimalna vrijednost napona za postizanje maksimalnog prinosa ukupnih fenola je 25 kV, a optimalno vrijeme trajanja tretiranja je 9 minuta. Optimalna vrijednost udjela ukupnih fenola za LHA uzorke iznosi 13,7924 mg/g_{s.tv.}.

4.4.2.3. Statistička analiza pH vrijednosti

Iz Pareto dijagrama u prilogu 6, zaključuje se kako napon i vrijeme tretiranja, njihove interakcije te kvadratna interakcija vremena tretiranja, nemaju statistički značajan utjecaj na pH LHA uzoraka. Rezultati analize varijance također pokazuju da ulazni parametri, napon i vrijeme tretiranja kao i njihove interakcije, nemaju statistički značajan utjecaj na pH ($p > 0,05$).

Optimalna vrijednost pH iznosi 6,64248, a postiže se pri naponu od 25 kV i u vremenu tretiranja od 6,21884 minuta.

4.4.2.4. Statistička analiza električne vodljivosti

Iz Pareto dijagrama u prilogu 6, zaključuje se da napon i vrijeme tretiranja, njihove interakcije te kvadratna interakcija vremena tretiranja, nemaju statistički značajan utjecaj na električnu vodljivost LHA uzoraka.

Rezultati analize varijance, LHA uzoraka za električnu vodljivost, pokazuju kako ulazni parametri, napon i vrijeme tretiranja kao i njihove interakcije, nemaju statistički značajan utjecaj ($p > 0,05$).

Optimalna vrijednost električne vodljivosti je 3,713 mS/cm . Rezultati optimizacije pokazali su da je optimalna vrijednost napona 25 kV i vrijeme tretiranja od 9 min.

4.5. Rezultati statističke obrade podataka toplinskih ekstrakcija

Za obradu rezultata toplinskih ekstrakcija korišten je program Microsoft Excel 365. Pomoću ANOVA testa analize varijance, određena je statistička značajnost utjecaja vremena tretiranja (3, 6 i 9 min) na izlazne vrijednosti ukupnih proteina, ukupnih fenola, pH i električne vodljivosti, uz interval pouzdanosti od 95,0 %.

ANOVA analiza LD0 uzoraka, pokazala je statističku značajnost vremena tretiranja na prinos ukupnih proteina i ukupnih fenola u ekstraktu ($p < 0,05$) (tablica 7). ANOVA analizom pH vrijednosti i električne vodljivosti, dobivene p-vrijednosti su veće od 0,05 što znači da vrijeme tretiranja nema statistički značajan utjecaj na pH i električnu vodljivost LD0 uzoraka.

Tablica 7. Statistička značajnost vremena tretiranja za UP, UF, pH i G LD0 uzoraka

	p-vrijednost
UP	0,000040105
UF	0,017828
pH	0,637159
G	0,521724

*UP-ukupni proteini; UF-ukupni fenoli, G-električna vodljivost

*utjecaj parametra je statistički značajan ako je $p < 0,05$, statistički značajne vrijednosti su označene crveno

5. ZAKLJUČCI

Obrada rezultata istraživanja dovela je do slijedećih zaključaka:

1. Ekstrakcija proteina i sekundarnih biljnih metabolita iz suhog lišća šećerne repe, uspješno je provedena visokonaponskim električnim pražnjenjem.
2. HVED potpomognutom ekstrakcijom, dobiven je 13,6 % veći prinos ukupnih proteina u odnosu na konvencionalnu metodu ekstrakcije. Najveći prinos ukupnih proteina od $85,6704 \pm 2,38$ mg/g_{s.tv.}. Zabilježen je u uzorku LHN4 (radni plin dušik, uvjeti: 9 min, 25 kV).
3. HVED potpomognutom ekstrakcijom postignuti su 8,5 % manji prinosi ukupnih fenola u odnosu na konvencionalnu metodu ekstrakciju. Najveći prinos ukupnih fenola od $14,1036 \pm 0,15$ mg /g_{s.tv.} zabilježen je u LD0/3 uzorku (uvjeti: 60 °C, 3 min).
4. HVED tretman doveo je do većih promjena električne vodljivosti i pH vrijednosti uzoraka, u odnosu na konvencionalnu metodu ekstrakciju.
5. Statističkom obradom podataka, utvrđeno je kako napon i vrijeme tretiranja nemaju statistički značajan utjecaj ($p > 0,05$) na prinos ukupnih proteina, ukupnih fenola, pH i električnu vodljivost HVED tretiranih uzoraka.
6. Statističkom obradom podataka, utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) vremena tretiranja na prinos ukupnih proteina i ukupnih fenola u toplinski tretiranim uzorcima.

6. LITERATURA

Anema SG (2019) Age Gelation, Sedimentation, and Creaming in UHT Milk: A Review. *CRFSFS* **18**, 140-166.

Antony A, Farid, M (2022) Effect of Temperatures on Polyphenols during Extraction. *Appl Sci* **12**, 2107. <https://doi.org/10.3390/app12042107>

Akyüz A, Ersus S (2020) Optimization of enzyme assisted extraction of protein from the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves for alternative plant protein concentrate production. *Food Chem* **335**, 127673. doi:10.1016/j.foodchem.2020.127

Akiyama H, Akiyama M (2021) Pulsed Discharge Plasmas in Contact with Water and their Applications. *TEEE* **16**, 6-14. doi.org/10.1002/tee.23282

Andersson I, Backlund A (2008) Structure and function of Rubisco. *Plant Physiol Biochem* **46**, 275-271. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.01.001>

Babbar N, Oberoi HS, Sandhu SK, Bhargav VK (2014) Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants. *J Food Sci Technol* **51**, 2568-75. doi: 10.1007/s13197-012-0754-4

Barbeau WE, Kinsella JE (1988) Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) from green leaves—Potential as a food protein. *Food Rev Int* **4**, 93–127. doi.org/10.1080/87559128809540823

Bradshaw JE (2010) Root and Tuber Crops: Hand Book of Plant Breeding. U: Biancardi E, McGrath JM, Panella LW, Lewellen RT, Stevanato P (ured.) Sugar Beet. Scottish Crop Research Institute, str. 173-177.

Barišić V, Flanjak I, Kopjar M, Benšć M, Jozinović A, Babić J, Šubarić D, Miličević B, Doko K, Jašić M, Ačkar Đ (2020) Does High Voltage Electrical Discharge Treatment Induce Changes in Tannin and Fiber Properties of Cocoa Shell *Foods* **9**, 810. <https://dx.doi.org/10.3390%2Ffoods9060810>

Balentović V (2016) Agrotehnika šećerne repe (*Beta vulgaris* L. Var. *Saccharifera* ALEF) (završni rad) Poljoprivredni fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

Boussetta N, Vorobiev E (2014) Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *C R Chimie* **17**, 197–203.

<https://doi.org/10.1016/j.crci.2013.11.011>

Boussetta (2010) Intensification of polyphenols extraction by electrotechnologies for the valorization of grape pomace (thesis), University of Technology of Compiègne, Compiègne.

Barbeau, W (1990) Functional properties of leaf proteins: Criteria required in food applications. *IJFS* **4**, 213–225.

Claverie A, Deroy J, Boustie M, Avrillaud G, Chuvatin A, Mazanchenko E, Demol G, Dramane B (2014) Experimental characterization of plasma formation and shockwave propagation induced by high power pulsed underwater electrical discharge. *Rev Sci Instrum* **85**, 063701 doi: 10.1063/1.4879715

Carlsson R, Hanczakowski (1985) The nutritive value of mixtures of white leaf protein and food proteins. *SCI* **36**, 946 - 950. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740361007>

Cheyrier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S (2013) Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol and Biochem* **72**, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>.

Dasan, BG, Boyaci IH (2017) Effect of Cold Atmospheric Plasma on Inactivation of *Escherichia coli* and Physicochemical Properties of Apple, Orange, Tomato Juices, and Sour Cherry Nectar. *Food and Bioproc Tech* **11**(2), 334–343. doi:10.1007/s11947-017-2014-0

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 Hydrocoll* **109**, 106101. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106101>

Di Stefano E, Agyei D, Njoku E, Chibuike C, Udenigwe (2018) Plant RuBisCo: An Underutilized Protein for Food Applications. *J Am Oil Chem Soc* **95**, 1063–1074. doi10.1002/aocs.12104

Dai J, Mumper JR (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **15**, 7313-7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>

Ellis RJ (1979) Most abundant protein in the world, *Trends Biochem Sci* **4**, 241-244.

Fragoso MA, Van Beusichem C, Houwers ML, Branco A, Serrão MAC, Fernandes MG, Pires F. P (1993) Foliar diagnosis of sugarbeet: Mineral composition of leaves of different physiological age during the season. *J of Plant Nutr* **53**, 137-146.

Gasanova (2013) Aqueous-phase electrical discharges: generation, investigation and application for organics removal from water (Dissertation), Institut für Instrumentelle Analytische Chemie Der Universität Duisburg, Essen.

Gil MI., Ferreres F, Tomas-Barberan FA (1998) Effect of modified atmosphere packaging on the flavonoids and vitamin C content of minimally processed Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*). *J Agric Food Chem* **46**, 2007–2012.

González Mera I, González Falconí D, Morera Córdova V (2019) Secondary metabolites in plants: main classes, phytochemical analysis and pharmacological activities. *Rev bionatura* **4**, 100-1009. [10.21931/RB/2019.04.04.11](https://doi.org/10.21931/RB/2019.04.04.11)

Gravel A, Doyen A (2019) The use of edible insect proteins in food: Challenges and issues related to their functional properties, *IFSET* **59**, 102272. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102272>

Gupta A, Naraniwal M, Kothari V (2012) Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *IJANS* **1**, 8-26.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021a. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=52482>>.019.04.04.11> Pristupljeno 27.5.2022.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021b. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=7975> Pristupljeno 16.1.2023.

Jiang B, Zheng J, Qiu S, Wu M, Zhang Q, Yan Z, Xue Q (2014) Review on electrical discharge plasma technology for wastewater remediation. *Chem Eng J* **236**, 348–368. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.09.090>

Kregar Z. (2008) Spektroskopska karakterizacija hladne plazme, (diplomski rad), Prirodoslovno matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Kiple, KF, Ornelas, KC (2000) *The Cambridge World History of Food*, 2. izd. Cambridge University Press, New York.

Kiskini, A. (2017) Sugar beet leaves: from biorefinery to techno-functionality (doktorski rad) Wageningen University. <https://doi.org/10.18174/421994>

Kiskini, A., Vissers, A., Vincken, J.-P., Gruppen, H., & Wierenga, P. A. (2016) Effect of Plant Age on the Quantity and Quality of Proteins Extracted from Sugar Beet (*Beta vulgaris L.*) Leaves. *J Agric Food Chem* **64**(44), 8305–8314. doi:10.1021/acs.jafc.6b03095

Lammens, T. M., Franssen, M. C. R., Scott, E. L., & Sanders, J. P. M. (2012) Availability of protein-derived amino acids as feedstock for the production of bio-based chemicals.

Biomass and Bioenergy **44**, 168–181. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.04.021>

Loveday SM (2020) Plant protein ingredients with food functionality potential. *Nutr Bull* **45**(3), 321-327. doi:10.1111/nbu.12450

Loveday SM, Hindmarsh JP, Creamer LK, Singh, H (2010) Physicochemical changes in intermediate-moisture protein bars made with whey protein or calcium caseinate. *Food Res Int* **43**, 1321-1328. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.013>

Li Z, Fan Y, Xi J (2019) Recent advances in high voltage electric discharge extraction of bioactive ingredients from plant materials. *Food Chem* **277**, 246-260. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.10.119.

Tamayo Tenorio A (2017) Sugar beet leaves for functional ingredients (PhD thesis). Wageningen University, Wageningen, NL

Tenorio AT, Schreuders FKG, Zisopoulos, FK, Boom RM, Van der Goot A J (2017) Processing concepts for the use of green leaves as raw materials for the food industry. *J Clean Prod* **164**, 736–748. <https://doi.org/10.1016/j.>

Maravić N, Teslić N, Nikolić D, Dimić I, Šereš Z, Pavlić B (2022) From agricultural waste to antioxidant-rich extracts: Green techniques in extraction of polyphenols from sugar beet leaves. *Sustainable Chem Pharm* **28**, 100728. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100728>.

Manickavasagan A (2020) Pulses: Processing and Product Development. *Springer Nature*, Switzerland, str. 27-29.

Merodio C, Sabater B (1988) Preparation and properties of a white protein fraction in high yield from sugar beet (*Beta vulgaris* L) leaves. *J Sci Food and Agric* **44**, 237-243.

doi:10.1002/jsfa.2740440305

Minea AA (2019) A Review on Electrical Conductivity of Nanoparticle-Enhanced Fluids. *Nanomaterials* **9(11)**, 1592. doi: 10.3390/nano9111592.

Maillard MN, Berset C (1995) Evolution of Antioxidant Activity during Kilning: Role of Insoluble Bound Phenolic Acids of Barley and Malt. *J Agric Food Chem* **43**, 1789–1793.

Nutrizio M, Pataro G, Carullo D, Carpentieri S, Mazza L, Ferrari G, Chemat F, Banović M, A Režek Jambrak (2020) High Voltage Electrical Discharges as an Alternative Extraction Process of Phenolic and Volatile Compounds from Wild Thyme (*Thymus serpyllum* L.): In Silico and Experimental Approaches for Solubility Assessment. *Mol* **25**, 4131.

doi:10.3390/molecules25184131

Nutrizio M, Kljusic JG, Marijanovic, Z, Dubrovic I, Viskic M, Mikolaj E, Chema, F, Jambrak AR (2020) The Potential of High Voltage Discharges for Green Solvent Extraction of Bioactive Compounds and Aromas from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)-Computational Simulation and Experimental Methods. *Mol* **25**, 3711. 10.3390/molecules25163711.

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)

Pankaj SK, Wan Z, Colonna W, Keener KM (2017) Effect of high voltage atmospheric cold plasma on white grape juice quality. *J Sci Food Agric* **97(12)**, 4016–4021.;doi:10.1002/jsfa.8268

Pyo YH, Lee TC, Logendra L, Rosen RT (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. *Food Chem* **85**, 19–26.

Pankaj SK, Wan Z, Keener MK (2018) Effects of Cold Plasma on Food Quality: A Review. *Foods* **7(1)**, 4. doi: 10.3390/foods7010004.

Picot-Allain C, Fawzi Mahomoodally M, Ak G, Zengin G (2021) Conventional versus green extraction techniques — a comparative perspective. *Curr Opin Food Sci* **40**, 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.009>

Prigent SV, Voragen AG, Visser AJ, van Koningsveld GA, Gruppen H (2007) Covalent interactions between proteins and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid). *J Sci Food Agric* **87**, 2502-2510.

Rommi K Hakala, Holopainen TK, Nordlund U, Poutanen E, Lantto K (2014) Effect of enzyme-aided cell wall disintegration on protein extractability from intact and dehulled rapeseed (*Brassica rapa* L. and *Brassica napus* L.) press cakes. *J Agric Food Chem* **62**, 7989-7997.

Rapić V (2008) Postupci priprave i izolacije organskih spojeva, 2. izd, Školska knjiga, Zagreb, str. 52-56.

Shah, FH, Salam Sheikh A, Farrukh N, Rasool A (1980) A comparison of leaf protein concentrate fortified dishes and milk as supplements for children with nutritionally inadequate diets. *Plant Food Hum Nutr* **30**, 245–258. <https://doi.org/10.1007/BF01094029>

Subba Rau BH, Ramana KVR, Singh N (1972) Studies on nutritive value of leaf proteins and some factors affecting their quality. *SCI* **23**, 233-245. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740230211>

Sheen SJ, Sheen VL (1985) Functional properties of fraction protein from tobacco leaf., *J Agric Food Chem* **33**, 79–83. <https://doi.org/10.1021/jf00061a023>

Sheen JS (1991) Comparison of Chemical and Functional Properties of Soluble Leaf Proteins from Four Plant Species. *J Agric Food Chem* **39**, 681-685. doi.org/10.1021/jf00004a011

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* **16**, 144-158.

Tiwari R, Rana C (2015) Plant secondary metabolites: a review. *Int J Eng Res Gen Sci* **3**, 661-70.

van Krimpen MM, Bikker P, van der Meer IM, van der Peet-Schwering CMC, Vereijken JM (2013) Cultivation, processing and nutritional aspects for pigs and poultry of European protein sources as alternatives for imported soybean products. Wageningen, The Netherlands

Wang W, Scali M, Vignani R, Spadafora A, Sensi E, Mazzuca S, Cresti, M, Vissers A, Kiskini A, Hilgers R, Marinea M, Alexander Wierenga P, Gruppen H, Vincken JP (2017) Enzymatic Browning in Sugar Beet Leaves (*Beta vulgaris* L.): Influence of Caffeic Acid Derivatives,

Oxidative Coupling, and Coupled Oxidation. *J Agric Food Chem* **65**, 4911–4920.
<https://doi.org/10.1021%2Facs.jafc.7b01897>

Wadhwa A, Jadhav A, Arsul V (2014) Plant proteins applications: a review. *WJPPS* **3**, 702-712.

Waterborg JH, Matthews HR (1984) The Lowry method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* **1**, 1-3. <http://dx.doi.org/10.1385/0-89603-062-8:1>

Weidner S, Chrzanowski S, Karamać M, Król A, Badowiec A, Mostek A, Amarowicz R (2014) Analysis of Phenolic Compounds and Antioxidant Abilities of Extracts from Germinating *Vitis californica* Seeds Submitted to Cold Stress Conditions and Recovery after the Stress. *Int J Mol Sci* **15**, 16211-16225. <https://doi.org/10.3390/ijms150916211>.

Wink M (1997) Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles. *Adv Bot Res* **25**, 141-169.

Zengin, G, Aktumsek A, Guler GO, Cakmak YS, Giron-Calle J, Alaiz M, Vioque J (2012) Nutritional quality of protein in the leaves of eleven Asphodeline species (*Liliaceae*) from Turkey. *Food Chem* **135**, 1360–1364.

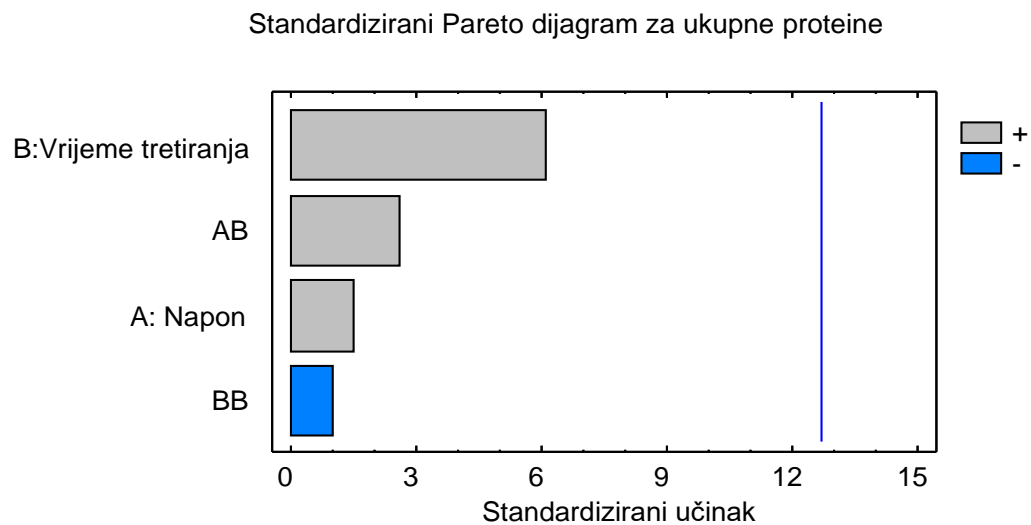
PRILOZI

Prilog 1.

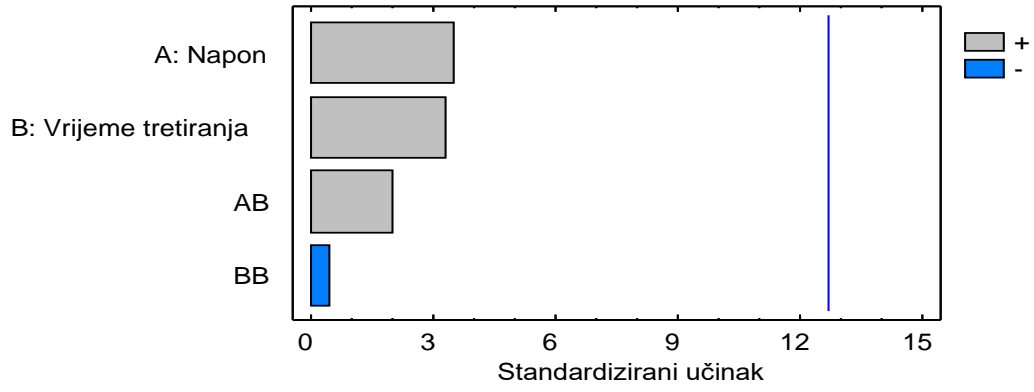
Standardizirani Pareto dijagrami za uzorak **LHN**. Prikazuju statističku značajnost napona i vremena tretiranja (ulazni parametri) na ukupne proteine, ukupne fenole, pH i električnu vodljivost. Plava linija predstavlja krajnju vrijednost statističke značajnosti utjecaja.

AB- interakcija napona i vremena tretiranja

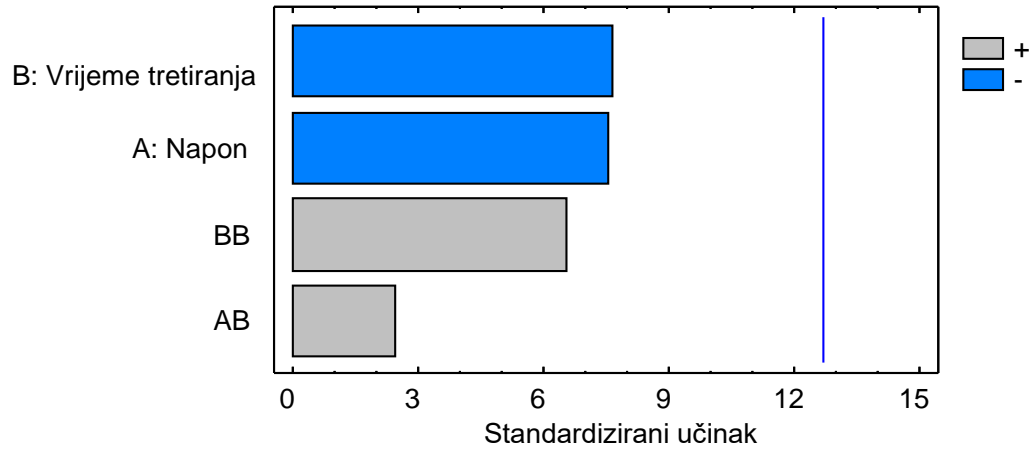
BB-kvadratna interakcija vremena tretiranja



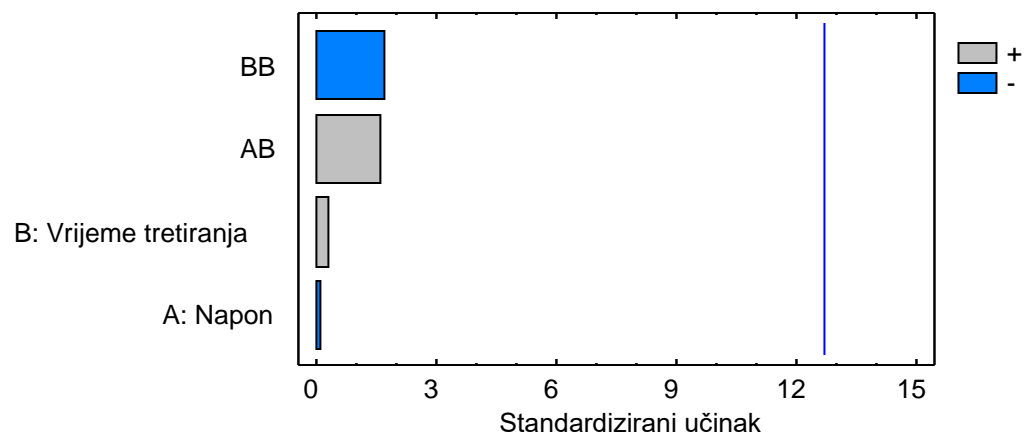
Standardizirani Pareto dijagram za ukupne fenole



Standardizirani Pareto dijagram za pH



Standardizirani Pareto dijagram za električnu vodljivost



Prilog 2.

Tablice analize varijanci za ukupne proteine, ukupne fenole, pH i električnu vodljivost uzorka LHN

Analiza varijance za ukupne proteine

<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:Napon	2,26976	1	2,26976	2,06	0,3878
B:Vrijeme tretiranja	40,174	1	40,174	36,38	0,1046
AB	7,09672	1	7,09672	6,43	0,2392
BB	0,994261	1	0,994261	0,90	0,5167
Ukupna pogreška	1,10441	1	1,10441	-	-
Ukupno (korelacija)	51,6392	5	-	-	-

$$R^2 = 97,8613 \%$$

$$R^2 \text{ (prilagođeno za stupnjeve slobode)} = 89,3065 \%$$

$$\text{Standardna pogreška procjene} = 1,05091$$

$$\text{Srednja apsolutna pogreška} = 0,404495$$

$$\text{Durbin-Watson statistika} = 3,08333$$

$$\text{Lag 1 rezidualna autokorelacija} = -0,75$$

Analiza varijance za ukupne fenole

<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:Napon	0,977589	1	0,977589	11,92	0,1795
B:Vrijeme tretmana	0,855357	1	0,855357	10,43	0,1912
AB	0,310387	1	0,310387	3,78	0,3023
BB	0,0138419	1	0,0138419	0,17	0,7518
Ukupna pogreška	0,0820135	1	0,0820135	-	-
Ukupno (korelacija)	2,23919	5	-	-	-

$$R^2 = 96,3374 \%$$

R^2 (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 81,6868 %
 Standardna pogreška procjene = 0,28638
 Srednja apsolutna pogreška = 0,110228
 Durbin-Watson statistika = 3,08333
 Lag 1 residualna autokorelacija = -0,75

Analiza varijance za pH

<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:Napon	0,00120417	1	0,00120417	56,45	0,0842
B:Vrijeme tretiranja	0,001225	1	0,001225	57,42	0,0835
AB	0,000121	1	0,000121	5,67	0,2531
BB	0,000901333	1	0,000901333	42,25	0,0972
Ukupna pogreška	0,0000213333	1	0,0000213333	-	-
Ukupno(korelacija)	0,00347283	5	-	-	-

$R^2 = 99,3857$ %
 R^2 (prilagođen za stupnjeve slobode) = 96,9285 %
 Standardna pogreška procjene = 0,0046188
 Srednja apsolutna pogreška = 0,00177778
 Durbin-Watson statistika = 3,08333
 Lag 1 rezidualna autokorekcija = -0,75

Analiza varijanci za električnu vodljivost

<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:Napon	0,0000135	1	0,0000135	0,01	0,9527
B:Vrijeme tretiranja	0,00013225	1	0,00013225	0,05	0,8543
AB	0,00570025	1	0,00570025	2,34	0,3686
BB	0,00658008	1	0,00658008	2,70	0,3480
Ukupna pogreška	0,00243675	1	0,00243675	-	-
Ukupno (korelacija)	0,0148628	5	-	-	-

$$R^2 = 83,6051\%$$

$$R^2 \text{ (prilagođeno za stupnjeve slobode)} = 18,0254\%$$

$$\text{Standardna pogreška procijene} = 0,0493634$$

$$\text{Srednja apsolutna pogreška} = 0,019$$

$$\text{Durbin-Watson statistika} = 3,08333$$

$$\text{Lag 1 rezidualna autokorelacija} = -0,75$$

Prilog 3.

Jednadžbe regresije za ukupne proteine, ukupne fenole, pH i električnu vodljivost uzorka **LHN**;
UP-ukupni proteini; UF- ukupni fenoli; G-električna vodljivost; U-napon; T-vrijeme tretiranja.

Jednadžba regresije za ukupne proteine

$$UP = 89,745 - 0,819565 \cdot U - 1,78819 \cdot T + 0,177598 \cdot U \cdot T - 0,0959485 \cdot T^2$$

Jednadžba regresije za ukupne fenole

$$UF = 12,9258 - 0,0613904 \cdot U - 0,54569 \cdot T + 0,0371416 \cdot U \cdot T - 0,011321 \cdot T^2$$

Jednadžba regresije za pH

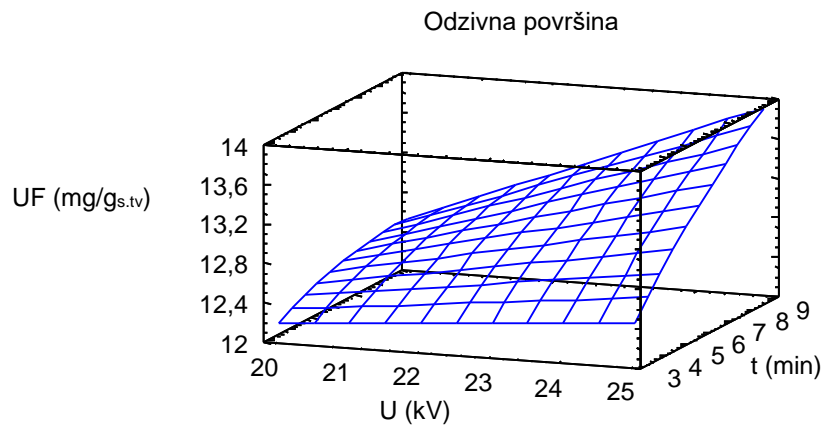
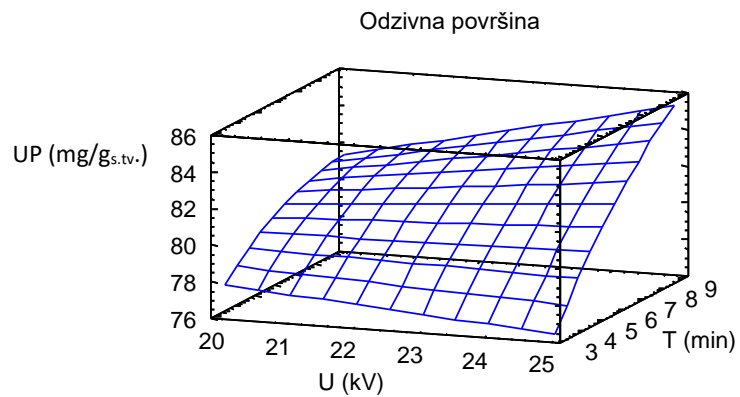
$$pH = 6,979 - 0,0100667 \cdot U - 0,057 \cdot T + 0,000733333 \cdot U \cdot T + 0,00288889 \cdot T^2$$

Jednadžba regresije za električnu vodljivost

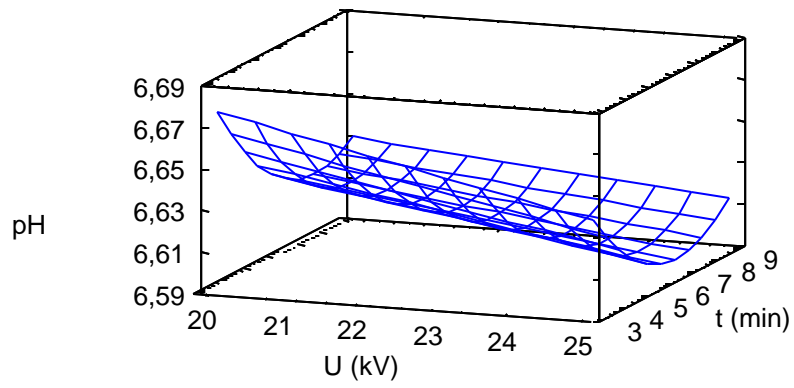
$$G = 4,1085 - 0,0308 \cdot U - 0,0176667 \cdot T + 0,00503333 \cdot U \cdot T - 0,00780556 \cdot T^2$$

Prilog 4.

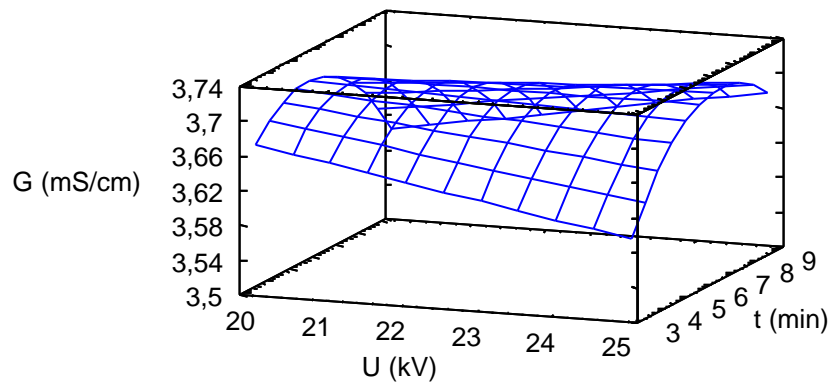
Trodimenzionalni dijagrami odzivne površine za ukupne proteine, ukupne fenole, pH i električnu vodljivost uzorka **LHN**. UP-ukupni proteini; UF- ukupni fenoli; G-električna vodljivost; U- napon; t-vrijeme tretiranja.



Odzivna površina



Odzivna površina



Prilog 5.

Optimizacija ulaznih parametara za maksimalne izlazne vrijednosti ukupnih proteina, ukupnih fenola, pH i električne vodljivosti za uzorak LHN.

Cilj: maksimizirati vrijednosti izlaznih parametara

Rezultati optimizacije za UP

Optimalna vrijednost = 85,3499 mg/g _{s.tv.}

<i>Faktor</i>	<i>Najmanja vrijednost</i>	<i>Najviša vrijednost</i>	<i>Optimalna vrijednost</i>
Napon	20,0	25,0	25,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0

Rezultati optimizacije za UF

Optimalna vrijednost = 13,9197 mg/g _{s.tv}

<i>Faktor</i>	<i>Najmanja vrijednost</i>	<i>Najveća vrijednost</i>	<i>Optimalna vrijednost</i>
Napon	20,0	25,0	25,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0

Rezultati optimizacije za pH

Optimalna vrijednost = 6,67667

<i>Faktor</i>	<i>Najmanja vrijednost</i>	<i>Najveća vrijednost</i>	<i>Optimalna vrijednost</i>
Napon	20,0	25,0	20,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	3,0

Rezultati optimizacije za električnu vodljivost

Optimalna vrijednost = 3,71314 mS/cm

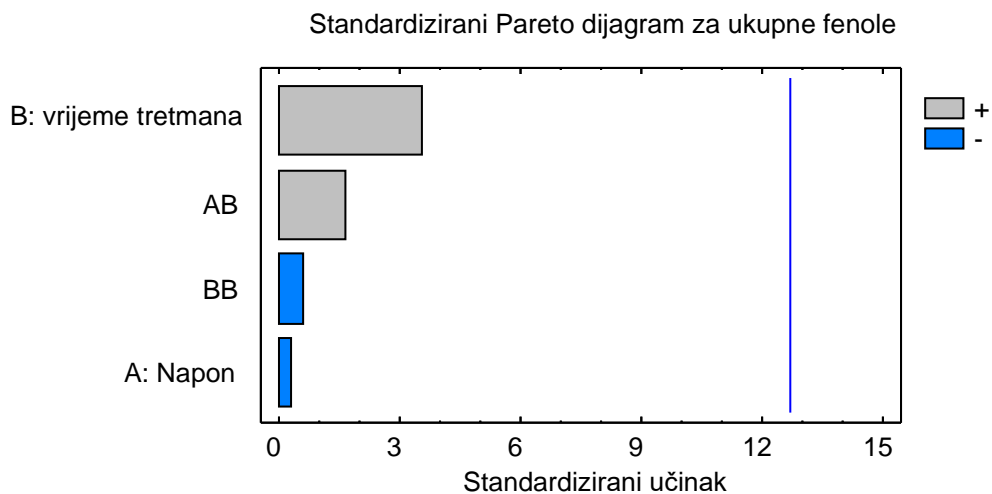
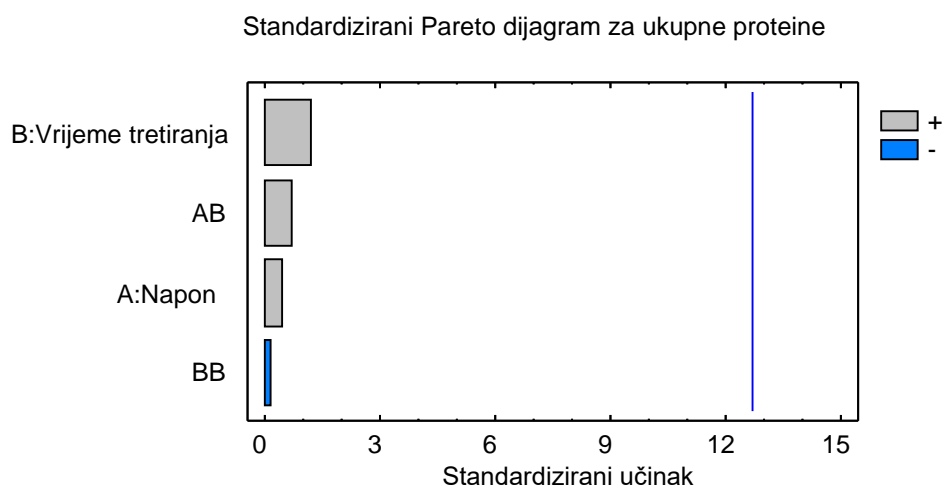
<i>Faktor</i>	<i>Najmanja vrijednost</i>	<i>Najveća vrijednost</i>	<i>Optimalna vrijednost</i>
Napon	20,0	25,0	20,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	5,31596

Prilog 6.

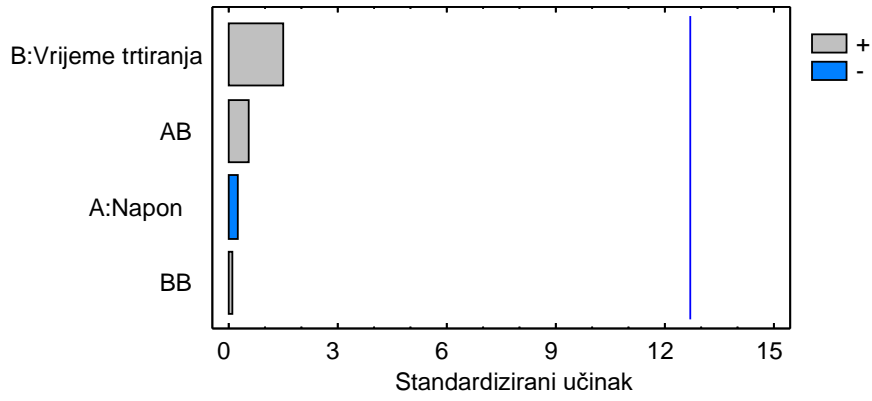
Standardizirani Pareto dijagrami za uzorak **LHA**. Prikazuju statističku značajnost napona i vremena tretiranja (ulazni parametri) na ukupne proteine, ukupne fenole, pH i električnu vodljivost. Plava linija predstavlja krajnju vrijednost statističke značajnosti utjecaja.

AB- interakcija napona i vremena tretiranja

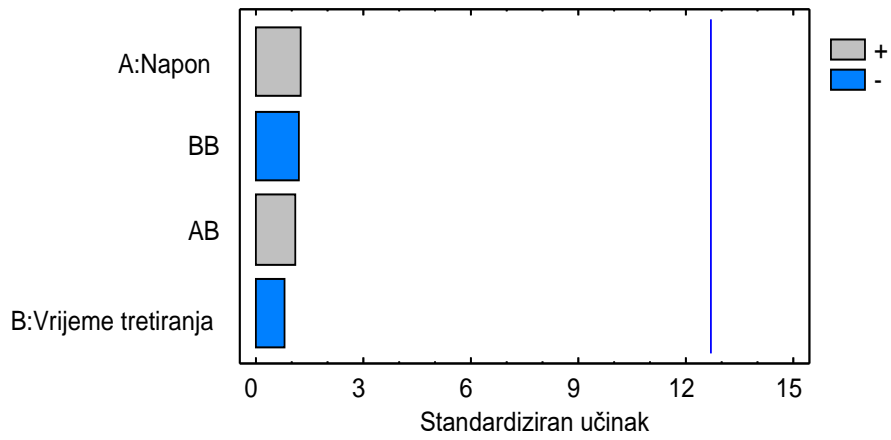
BB-kvadratna interakcija vremena tretiranja



Standardizirani Pareto dijagram za električnu vodljivost



Standardizirani Pareto dijagram za pH



Prilog 7.

Tablice analize varijanci (MANOVA) za ukupne proteine, ukupne fenole, pH i električnu vodljivost uzorka **LHA**

Analiza varijance za ukupne proteine

<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:Napon	5,72705	1	5,72705	0,14	0,7687
B:Vrijeme tretiranja	53,4166	1	53,4166	1,35	0,4526
AB	15,698	1	15,698	0,40	0,6424
BB	0,288816	1	0,288816	0,01	0,9458
Ukupna pogreška	39,6229	1	39,6229		
Ukupno (korelacija)	114,753	5			

$$R^2 = 65,4712 \%$$

$$R^2(\text{prilagođeno za stupnjeve slobode}) = 0,0 \%$$

$$\text{Standardna pogreška procjene} = 6,29467$$

$$\text{Srednja apsolutna pogreška} = 2,42282$$

$$\text{Durbin-Watson statistika} = 3,08333$$

$$\text{Lag 1 rezidualna autokorelacija} = -0,75$$

Analiza varijance za ukupne fenole

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupanj slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
A:Napon	0,00543597	1	0,00543597	0,05	0,8562
B:Vrijeme tretiranja	1,25229	1	1,25229	12,17	0,1777
AB	0,26669	1	0,26669	2,59	0,3538
BB	0,0301373	1	0,0301373	0,29	0,6842
Ukupna pogreška	0,102872	1	0,102872		
Ukupno (korelacija)	1,65742	5			

$R^2 = 93,7932 \%$
 R^2 (prilagođeno za stupnjeve slobode) = $68,9661 \%$
 Standardna pogreška procjene = $0,320737$
 Srednja apsolutna pogreška = $0,123452$
 Durbin-Watson statistika = $3,08333$
 Lag 1 rezidualna autokorelacija = $-0,75$

Analiza varijance za pH

<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:Napon	0,00106667	1	0,00106667	1,45	0,4413
B:Vrijeme tretiranja	0,000441	1	0,000441	0,60	0,5807
AB	0,000841	1	0,000841	1,14	0,4789
BB	0,00100833	1	0,00100833	1,37	0,4502
Ukupna pogreška	0,000736333	1	0,000736333		
Ukupno (korelacija)	0,00409333	5			

$R^2 = 82,0114 \%$
 R^2 (prilagođeno za stupnjeve slobode) = $10,057 \%$
 Standardna pogreška procijene = $0,0271355$
 Srednja apsolutna pogreška = $0,0104444$
 Durbin-Watson statistika = $3,08333$
 Lag 1 rezidualna autokorelacija = $-0,75$

Analiza varijance za električnu vodljivost

<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:Napon	0,000294	1	0,000294	0,05	0,8651
B:Vrijeme tretiranja	0,013689	1	0,013689	2,16	0,3806
AB	0,0016	1	0,0016	0,25	0,7038
BB	0,00000833333	1	0,00000833333	0,00	0,9769
Ukupna pogreška	0,006348	1	0,006348		
Ukupno (korelacija)	0,0219393	5			

$R^2 = 71,0657 \%$

R^2 (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 0,0 %
Standardna pogreška procijene = 0,0796743
Srednja apsolutna pogreška = 0,0306667
Durbin-Watson statistika = 3,08333
Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,75

Prilog 8.

Jednadžbe regresije za ukupne proteine, ukupne fenole, pH i električnu vodljivost uzorka **LHA**;

UP-ukupni proteini; UF- ukupni fenoli; G-električna vodljivost; U-napon; T-vrijeme tretiranja.

Jednadžba regresije za ukupne proteine

$$UP = 98,3066 - 1,19403 \cdot U - 4,10443 \cdot T + 0,264138 \cdot U \cdot T - 0,0517129 \cdot T^2$$

Jednadžba regresije za ukupne fenole

$$UF = 16,3533 - 0,218608 \cdot U - 0,387665 \cdot T + 0,0344281 \cdot U \cdot T - 0,0167048 \cdot T^2$$

Jednadžba regresije za pH

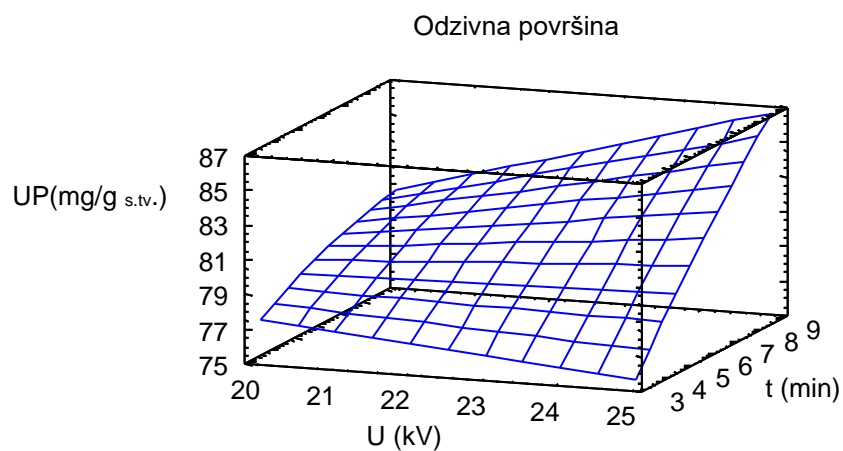
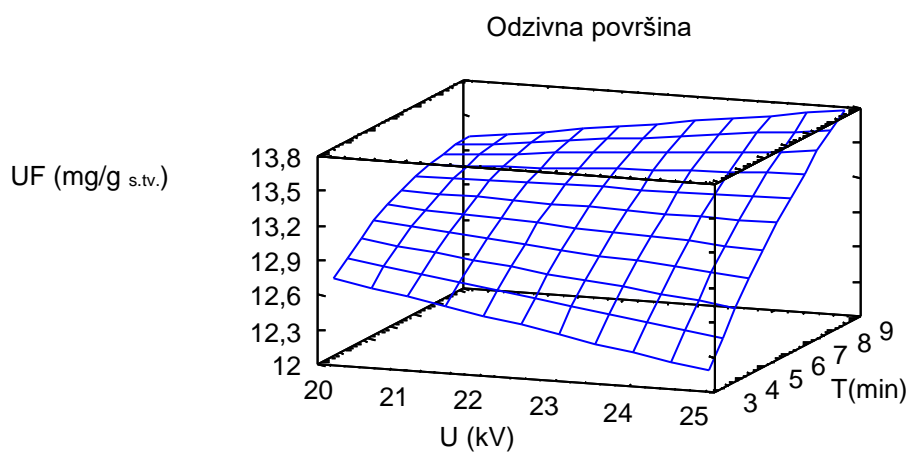
$$pH = 6,681 - 0,00626667 \cdot U - 0,0103333 \cdot T + 0,00193333 \cdot U \cdot T - 0,00305556 \cdot T^2$$

Jednadžba regresije za električnu vodljivost

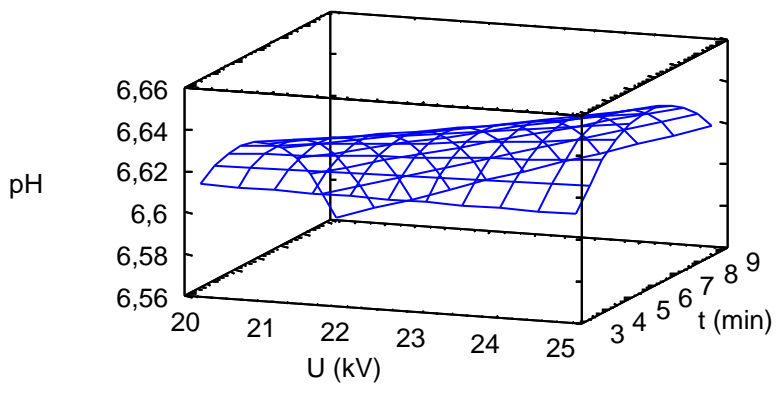
$$G = 3,955 - 0,0188 \cdot U - 0,0438333 \cdot T + 0,00266667 \cdot U \cdot T + 0,000277778 \cdot T^2$$

Prilog 9.

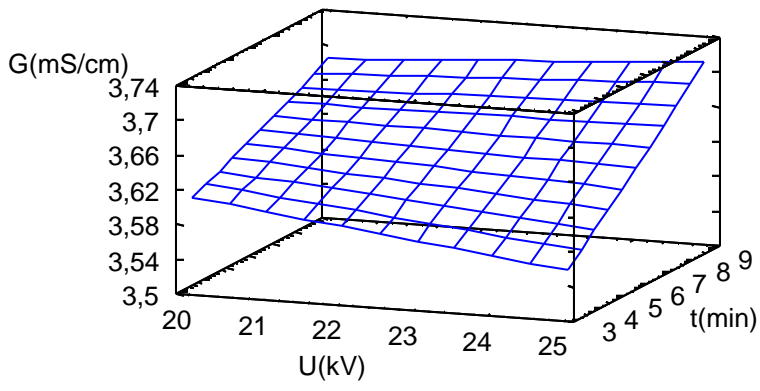
Trodimenzionalni dijagrami odzivne površine za ukupne proteine, ukupne fenole, pH i električnu vodljivost uzorka **LHA**. UP-ukupni proteini; UF- ukupni fenoli; G-električna vodljivost; U-napon; t-vrijeme tretiranja.



Odzivna površina



Odzivna površina



Prilog 10.

Optimizacija ulaznih parametara za maksimalne izlazne vrijednosti ukupnih proteina, ukupnih fenola, pH i električne vodljivosti za uzorak LHN.

Cilj: maksimizirati vrijednosti izlaznih parametara.

Rezultati optimizacije za UP

Optimalna vrijednost = 86,7582 mg/g s.tv.

<i>Faktor</i>	<i>Najmanja vrijednost</i>	<i>Najveća vrijednost</i>	<i>Optimalna vrijednost</i>
Napon	20,0	25,0	25,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0

Rezultati optimizacije za UF

Optimalna vrijednost = 13,7924 mg/g s.tv.

<i>Faktor</i>	<i>Najmanja vrijednost</i>	<i>Najveća vrijednost</i>	<i>Optimalna vrijednost</i>
Napon	20,0	25,0	25,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0

Rezultati optimizacije za pH

Optimalna vrijednost = 6,64248

<i>Faktor</i>	<i>Najmanja vrijednost</i>	<i>Najveća vrijednost</i>	<i>Optimalna vrijednost</i>
Napon	20,0	25,0	25,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	6,21884

Rezultati optimizacije za električnu vodljivost

Optimalna vrijednost= 3,713 mS/cm

<i>Faktor</i>	<i>Najmanja vrijednost</i>	<i>Najveća vrijednost</i>	<i>Optimalna vrijednost</i>
Napon	20,0	25,0	25,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja EMA RITOŠA 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