

Održiva obrada nusproizvoda iz proizvodnje kave ultrazvukom visoke snage

Grudenić, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:317039>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO- BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Anamarija Grudenić

1366/ PI

ODRŽIVA OBRADA
NUSPROIZVODA IZ PROIZVODNJE
KAVE ULTRAZVUKOM VISOKE
SNAGE

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

ZAHVALA

Najljepše se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak na pomoći, savjetima i prenesenom znanju prilikom izrade ovog diplomskog rada. Veliko hvala asistentici Marineli Nutrizio, mag. nutr. na nesebičnoj pomoći, uloženom vremenu i strpljenju pri izradi eksperimentalnog rada.

Zahvaljujem se izv.prof.dr.sc. Mojci Čakić Semenčić na pomoći i savjetima.

Zahvaljujem se gđi. Marijani Hudina Domladovec, dipl. ing., iz Francka d.d. na ustupljenim uzorcima srebrne pokožice kave te pomoći pri izradi ovog rada.

Hvala svim mojim dragim prijateljima i kolegama što su mi bili podrška te učinili studentski život lakšim i zabavnijim.

Posebno hvala Mateju, bratu, sestri i jednoj posebnoj osobi na podršci, razumijevanju i ljubavi.

A najveću zahvalu dugujem svojim roditeljima koji su vjerovali u mene i onda kada ja nisam. Hvala vam što se mi sve ovo omogućili, bez vaše bezuvjetne ljubavi, strpljenja i podrške sve ovo ne bi bilo moguće.

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

ODRŽIVA OBRADA NUSPROIZVODA IZ PROIZVODNJE KAVE ULTRAZVUKOM VISOKE SNAGE

Anamarija Grudenić, 1366/PI

Sažetak: *Primjenom ultrazvuka visoke snage (UAE) ekstrahirani su proteini i polifenoli iz srebrne pokožice kave u vodenom otapalu. Optimizacijom uvjeta ekstrakcije ispitan je utjecaj amplitude (50, 75, 100 %) i vremena tretiranja (3, 6, 9 min) na udio ekstrahiranih proteina i polifenola. Statistička analiza je provedena pomoću programa STATGRAPHICS te je statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) pokazala visina amplitude na udio ukupnih proteina, dok na udio ukupnih polifenola niti jedan od faktora nema statistički značajan utjecaj. Optimalni parametri za ekstrakciju proteina i polifenola dobivaju se pri amplitudi od 100 % i vremenu tretiranja od 9 minuta. Masena koncentracija proteina se u uzorcima kretala od 0,5126 do 1,1012 mg L⁻¹. Raspon ukupnih polifenola se kretao između 375,5722 i 525,6778 mg EGK (ekvivalent galne kiseline) 100 g⁻¹. Analizom izoliranih proteina određena je njihova prosječna masa i sastav.*

Ključne riječi: *ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, proteini, polifenoli, srebrna pokožica kave*

Rad sadrži: 58 stranica, 22 slika, 14 tablica, 61 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Pomoć pri izradi: Marinela Nutrizio, mag. nutr.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv.prof.dr.sc. *Mojca Čakić Semenčić*
2. prof. dr. sc. *Anet Režek Jambrak*
3. doc. dr. sc. *Sven Karlović*
4. izv. prof. dr. sc. *Tomislav Bosiljkov* (zamjena)

Datum obrane: 20. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of General Programmes

Laboratory for sustainable development

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

SUSTAINABLE PROCESSING OF COFFEE PRODUCTS BY HIGH POWER ULTRASOUND

Anamarija Grudenić, 1366/PI

Abstract: *Proteins and polyphenols from silver coffee skins in aqueous solvent are extracted (UAE) using high power ultrasound. By optimizing the extraction conditions, the influence of amplitude (50, 75, 100%) and treatment time (3, 6, 9 min) was examined. Statistical analysis was performed using the STATGRAPHICS program and a statistically significant effect ($p < 0.05$) showed the amplitude of height on the share of total proteins, while none of the factors has a statistically significant effect on the proportion of total polyphenols. Optimal parameters for protein and polyphenol extraction are obtained at an amplitude of 100% and a treatment time of 9 minutes. The mass concentration of protein in the samples ranged from 0.5126 to 1.1012 mg L⁻¹. The range of total polyphenols ranged between 375.5722 and 525.6778 mg GAE 100 g⁻¹. Analysis of isolated proteins determined their mass and composition.*

Keywords: *silverskin, ultrasound- assisted extraction, proteins, polyphenols*

Thesis contains: 58 pages, 22 figures, 14 tables, 61 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *Anet Režek Jambrak, PhD, Full Professor*

Technical support and assistance: *Marinela Nutrizio, MSc*

Reviewers:

1. PhD. *Mojca Čakić Semenčić*, Associate professor
2. PhD. *Anet Režek Jambrak*, Full professor
3. PhD. *Sven Karlović*, Assistant professor
4. PhD. *Tomislav Bosiljkov*, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 20 September 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1 KAVA	2
2.1.1 Proizvodnja kave	3
2.1.1.1 Suhi postupak	4
2.1.1.2 Mokri postupak.....	4
2.1.1.3 Prženje	4
2.1.2 Sastav srebrne pokožice kave (SPK)	6
2.2 PROTEINI	7
2.2.1 Građa proteina	7
2.2.2 Podjela proteina.....	8
2.2.3 Proteini u srebrnoj pokožici kave	8
2.3 POLIFENOLI.....	9
2.3.1 Podjela polifenola.....	9
2.3.2 Polifenoli prisutni u srebrnoj pokožici kave	10
2.4 ULTRAZVUK	11
2.4.1 Mehanizam djelovanja ultrazvuka.....	11
2.4.2 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. <i>Ultrasound-assisted extraction</i> , UAE)	13
2.4.3 Primjena ultrazvuka u prehrambenoj tehnologiji	15
2.5 ODRŽIVI RAZVOJ	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1 MATERIJAL	18
3.1.1 Pokožica kave.....	18
3.1.2 Kemikalije i standardi	18
3.1.3 Aparatura i pribor	20
3.2 METODE.....	21
3.2.1 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.....	21
3.2.2 Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola	24
3.2.3 Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry- u.....	26
3.2.4 Analiza aminokiselina	29
3.2.4.1 Hidroliza	29
3.2.4.2 Derivatizacija.....	29
3.2.4.3 Kvantitativna HPLC analiza	30
3.2.5 Gel filtracijska kromatografija (eng. <i>size exclusion chromatography</i> , SEC - HPLC).....	31
3.2.6 Natrijev dodecil sulfat –Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (eng. <i>Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis</i> , SDS- PAGE)	31

3.2.6.1	Ekstrakcija proteina i taloženje	31
3.2.6.2	Elektroforeza	32
3.2.6.3	Digestija proteina u gelu	32
3.2.6.4	Analiza peptida spektrometrom masa	32
3.2.6.5	Identifikacija proteina	32
3.2.7	Statistička analiza	32
4.	REZULTATI I RASPRAVA	34
4.1	Rezultati fizikalnih parametara tijekom izvođenja UAE	35
4.2	Utjecaj UAE na udio ukupnih polifenola	36
4.2.1	Statistička obrada rezultata i optimiranje parametara	38
4.3	Utjecaj UAE na udio ukupnih proteina	41
4.3.1	Statistička obrada rezultata i optimiranje parametara	42
4.4	Rezultati analize aminokiselina	45
4.5	Rezultati SEC- HPLC analize	48
4.6	Rezultati SDS- PAGE analize	48
5.	ZAKLJUČAK	51
6.	LITERATURA	52

1. UVOD

Nusproizvodi tehnološkog procesa su nutritivno vrlo bogate sirovine, a često su nepravedno zanemarene i nedovoljno iskorištene. U prehrambenoj industriji nastaju znatne količine nusproizvoda koje je potrebno adekvatno zbrinuti, a pri tome njihovo zbrinjavanje zahtijeva dodatne resurse (Zhang i sur., 2021). Jedna od grana prehrambene industrije je proizvodnja kave. Tijekom tehnološkog procesa proizvodnje kave nastaju znatne količine nusproizvoda, jer čak 90 % bobice kave završava kao otpad (Iriondo- DeHond i sur., 2020). Nusproizvodi proizvodnje kave su: ljuska, pulpa, srebrna pokožica kave i talog istrošene kave. Spoznavši te činjenice, stručnjaci su odlučili pridonijeti razvoju mogućnosti njihove upotrebe. Stoga je sve više istraživanja usmjereno na iskorištavanje upravo spomenutih nusproizvoda. Nusproizvodi kave su nutritivno bogate sirovine, sadrže velike količine hranjivih tvari poput vlakana, proteina, ugljikohidrata, različitih minerala i bioaktivnih spojeva. Velik su potencijal za proizvodnju hrane i funkcionalnih proizvoda podržavajući smjernice održivog razvoja prehrambene industrije.

Smjernice održivog razvoja potiču primjenu novih inovativnih tehnika u postupcima ekstrakcije. Jedna od njih je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visoke snage (eng. *Ultrasound- assisted extraction, UAE*). Njezine glavne prednosti su povećanje ekstrakcijskih prinosa te znatno smanjenje vremena ekstrakcije, utroška energije i količine otapala. Nove tehnike ekstrakcije podrazumijevaju primjenu ekološki prihvatljivih otapala. Cilj industrije je proizvoditi učinkovite proizvode, primjenom procesa koji su energetske učinkoviti i maksimalno iskoristiti resurse te smanjiti otpad. Globalni ciljevi održivog razvoja su prikazani u Agendi 2030 (UN, 2015), a svrha im je oblikovanje politika i strategija kontinuiranog gospodarskog i socijalnog napretka, bez štete za okoliš i prirodne izvore bitne za ljudske djelatnosti u budućnosti.

Stoga je cilj ovoga diplomskog rada bio izolirati proteine i polifenole primjenom UAE iz srebrne pokožice kave te spektrofotometrijski odrediti njihove udjele. Tijekom optimizacije procesa istražiti će se utjecaj parametra amplitude (50, 75, 100 %) i vremena (3, 6, 9 minuta) UAE na udio spomenutih spojeva. Analizom proteina će se utvrditi njihov sastav i karakteristike.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 KAVA

Kava (lat. *Coffea arabica* L.) je zimzeleni grm iz porodica broćika (lat. *Rubiaceae*). Drvenaste stabljike, naizmjenično postavljenih kožastih listova, gustih grozdastih cvjetova čiji su plodovi bobice zelene boje koje sazrijevanjem postaju tamnocrvene (slika 1). Raste i do 12 metara u visinu, ali se obično obrezuje na visinu od 2 metra kako bi berba bila praktičnija. Životni vijek biljke je između 20 i 30 godina. Plod kave je bobica, slična plodu trešnje unutar koje se nalazi sjemenka poznatija kao „zrno kave“ (DeLonghi, 2021).



Slika 1. Stablo i bobice kave (Janissen i Huynh, 2018; Wen, 2019)

Sjemenka je obavijena s nekoliko slojeva kao što su perikarp, mezokarp ili pulpa, unutarnji mezokarp (sloj sluzi), endokarp i srebrna pokožica kave (SPK). Naposljetku na zelenom zrnu kave zaostaje samo srebrna pokožica kave prije procesa prženja. Od sjemenke kave proizvodi se najpoznatiji napitak na svijetu- kava. Način pripreme ovog napitka je kuhanje prženih sjemenik kave u vrućoj vodi ili mlijeku. Današnji način pripreme se znatno sofisticirao, razlikujemo mnoštvo načina pripreme kave kao što su turska kava, espresso, irska kava (eng. *irish coffee*), kapučino (eng. *capuccino*), ledena kava, kava s mliječnom pjenom (eng. *caffelatte*), bijela kava itd. Šalica kave od 100 mL sadrži između 50 i 380 mg kofeina, 35- 500 mg klorogenske kiseline, 100 mg proteina, 0,8 mg lipida te između 250 i 700 mg različitih minerala. Sastav ovisi o sorti kave, načinu prženja zrna, načinu pripreme napitka i dodacima (Farah, 2012).

Idealni uvjeti rasta su topla i vlažna klima, temperature između 15 i 30 °C te vulkanska zemlja bogata dušikom. Prinos ovisi o uvjetima uzgoja te sorti kave. Prosječni godišnji prinos po biljci iznosi oko 900 g zelene kave. Poznato je dvadeset sorti kave, ali najzastupljenije sorte su Arabika, Canephora (Robusta), Dewevrei, Liberica. *Coffea Arabica* L. je najstarija sorta kave i najkvalitetnija. Karakterizira ju jača aroma i pun okus obilježen aromama karamela, čokolade i lješnjaka. Ne daje pjenu fine konzistencije i sadrži nižu koncentraciju kofeina. Ova sorta je najzastupljenija na tržištu (70 %). Zatim slijedi *Coffea Canephora* L. poznatija kao Robusta koja je oštrijeg i gorčeg okusa, pjenastija je i sadrži veću koncentraciju kofeina. Jeftinija je u odnosu na Arabicu. Često se miješa sa Arabicom kako bi se postigla optimalna svojstva. *Coffea Liberica* L. porijeklom je iz Liberije, izrazito je otporna na bolesti, sušu te ima visoke prinose. Sličnih je svojstava kao i Arabica. No, znatno je viša i krupnija od prethodne dvije vrste. *Coffea Dewevrei* L. poznatija kao kava Excelsa na koju otpada manje od 1 % svjetske proizvodnje (Clarke i Macrea, 1985).

Prirodno je rasprostranjena u tropskim zemljama Afrike. Kroz povijest se proširila na područje Arabije, a potom i Europe. No, danas se najviše uzgaja na području Južne Amerike (45 % svjetske proizvodnje). Najveći svjetski proizvođači sirove kave su: Brazil, Vijetnam, Kolumbija, Indonezija i Etiopija koja se smatra pradomovinom kave. Smatra se najvažnijim poljoprivrednim proizvodom međunarodne trgovine.

2.1.1 Proizvodnja kave

Postupak proizvodnje započinje berbom zrelih bobica. Potrebno je otprilike oko 210 dana da se od cvijeta razvije zreli plod. Berba se može vršiti ručno i mehanički pomoću strojeva. Ručna berba je zahtjevnija i skuplja, ali kvalitetnija jer se beru samo zrele bobice i nema stranih primjesa. Mehanička berba je brža i jeftinija, krajnji rezultat je lošija kvaliteta. Potrebno je sortirati bobice ovisno o stupnju zrelosti i otkloniti strane primjese (Šango, 2020).

Nakon toga započinje obrada bobica tj. zrna kave. Uklanja se pulpa i preostale ovojnice s bobice kako bi se izdvojilo zrno kave. Ovaj postupak se može provesti na dva načina: suhim postupkom i mokrim postupkom.

2.1.1.1 Suhi postupak

Suhi postupak započinje sušenjem bobica na osunčanim površinama kroz 2- 4 tjedna. Bobice se povremeno preokreću kako bi se spriječila fermentacija. Proces sušenja je završio kada udio vlage u zelenom zrnju kave iznosi manje od 12 % i najčešće traje oko 28 dana (Alves i sur., 2017). Osušena pokožica i pulpa kave se lako odvaja od zrna tijekom ljuštenja. Na zrnju preostaje samo srebrna pokožica te su zrna tada suha te spremna za čuvanje i pakiranje. Najčešće se koristi za obradu zrna sorte *Coffea Canephora* L. Suhi postupak je jednostavan i jeftin u odnosu na ostale. No, postoje određeni nedostaci poput nedovoljno osušenog zrna prilikom čega može doći do razvoja plijesni te presušeno zrno koje se lakše ošteti tijekom ljuštenja (Farah, 2012).

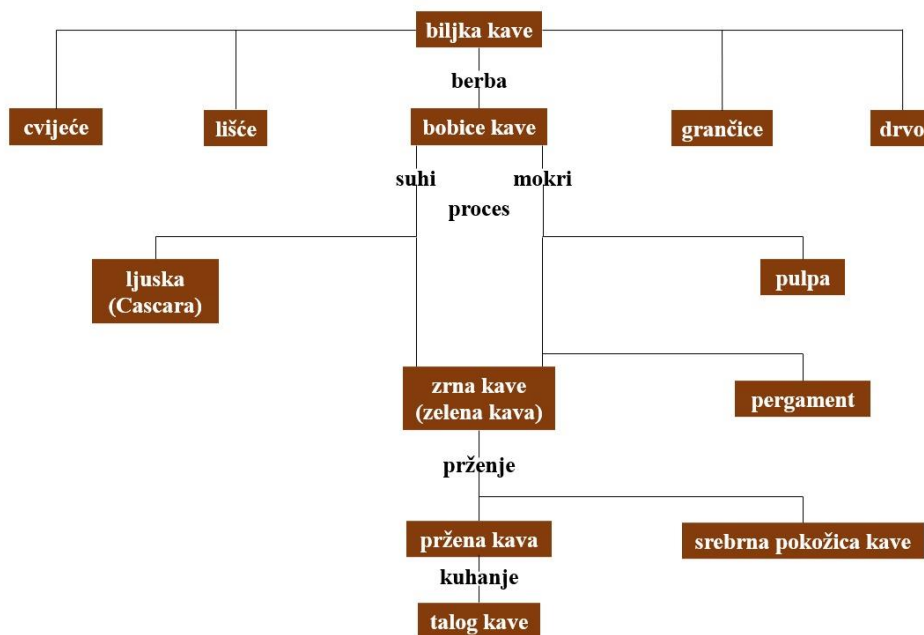
2.1.1.2 Mokri postupak

Mokrim postupkom bobice se uranjaju u vodu kako bi omekšale. Zatim se pomoću uređaja s oštricama uklanja omekšana pulpa. Za razliku od suhog postupka gdje je fermentacija nepoželjna, u ovom postupku se fermentacijom uklanja preostala pulpa i mukozni sloj djelovanjem proteolitičkih enzima. Fermentacija traje između 24 i 36 sati za *Coffea Arabica* L. te 72 sata za *Coffea Canephora* L., ovisi o koncentraciji proteolitičkih enzima i temperaturi. Prilikom čega dolazi do pada pH vrijednosti (Murthy i Madhava Naidu, 2012). Zrna se ispiru, poliraju i suše u struji toplog zraka (do 11 % vlažnosti). Mokri postupak je znatno složeniji i traje između 7 i 12 dana, ali je znatno kvalitetniji (Chala i sur., 2018).

2.1.1.3 Prženje

Sljedeći korak u obradi zrna je prženje. Tijekom prženja dolazi do brojnih fizikalno- kemijskih promjena koje utječu na senzorska svojstva kave. Jakost kave određuje stupanj prženja, zrna pržena na višoj temperaturi sadrže manje kofeina od onih prženih na nižoj temperaturi (Belitz i sur., 2004). Dok okus i kvalitetu određuje sorta kave. Tradicionalni način prženja se provodi na temperaturi između 200 i 220 °C, tijekom 10 do 15 minuta. Sastoji se od pet faza: prva vatra, prvo pucketanje, puni grad, drugo pucketanje i duboko prženje. Industrijski način prženja podrazumijeva primjenu rotirajućih grijaćih plinskih pržionika ili nepokretnih pržionika tijekom 15 do 20 minuta pri temperaturi do 220 °C. Prijenos topline se provodi direktnim kontaktom zrna sa stijenkama uređaja i konvekcijski u struji vrućeg zraka. Zbog brojnih nedostataka danas se češće koristi konvekcijski način prijenosa topline u vremenskom intervalu

od 6 do 15 minuta. No, istraživanja su pokazala kako je optimalan interval trajanja ovog procesa između 2 i 5 minuta (Šimunac, 2014). Slijedi hlađenje prženih zrna. Kontrola tehnološkog procesa se vrši primjenom računala. Stupanj prženja ovisi o navikama potrošača u pojedinim državama. Tijekom procesa prženja nastaje SPK kao nusprodukt. Prženo se zrno pakira u vreće i transportira u tvornice koje vrše daljnje obrade (Šango, 2020). Cjelokupni proces proizvodnje kao i nusprodukti su prikazani na slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz procesa proizvodnje kave i pripadajući nusprodukti (Klingel i sur., 2020)

2.1.2 Sastav srebrne pokožice kave (SPK)

SPK kao nusprodukt u proizvodnji kave bogati je izvor makro- i mikronutrijenata, kao što su vlakna, proteini, ugljikohidrati i minerali. Istraživanje koje su proveli Wen i suradnici (2020) pokazuje kako su prehrambena vlakna najzastupljeniji makro-nutrijent (64,45 %), a zatim proteini (14,62 %), ugljikohidrati (7,97 %) i masti (3,60 %). Vlakna su građena od celuloze, hemiceluloze i lignina. Glavni monosaharidi su ksiloza, galaktoza, arabinoza i manoza. Iriondo- DeHond i sur. (2020) su došli do sličnih spoznaja, udio vlakana je 62,4 %, proteina 18,8 % i masti 2,2 %. Dok se udio ugljikohidrata značajno razlikovao (44 %). Kemijski sastav SPK prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Procijenjeni sastav srebrne pokožice kave (g/ 100 g suhe mase) (Wen i sur., 2020)

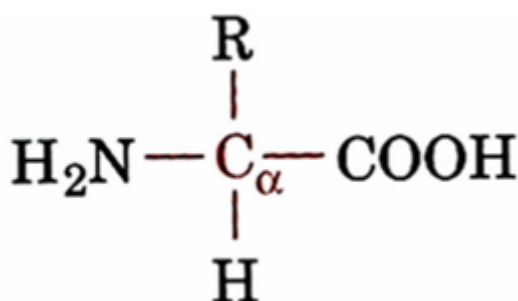
Naziv komponente	Količina (g/100 g)
Vlaga	5,89 ± 0,46
Proteini	14,62 ± 0,23
Mast	3,60 ± 0,29
Pepeo	3,47 ± 0,39
Vlakna	64,45 ± 1,63
Netopiva vlakna	54,7 ± 0,85
Topiva vlakna	9,75 ± 0,78
Ugljikohidrati	7,97 ± 0,44
Kalcij, Ca	1,48 ± 0,05
Kalij, K	1,21 ± 0,04
Magnezij, Mg	0,05 ± 0,01
Natrij, Na	0,05 ± 0,01
Željezo, Fe	0,04 ± 0,01

S druge strane, uspoređujući zastupljenost mikronutrijenata, najzastupljeniji je kalcij (1,48 %) te slijede kalij (1,21 %), magnezij (0,05 %), natrij (0,05 %) i željezo (0,04 %) (Wen i sur. 2019). No, rezultati koje su dobili Iriondo-DeHond i suradnici (2020) se znatno razlikuju: najzastupljeniji mineral je kalij (4,977 %), zatim magnezij (2,002 %), kalcij (0,584 %), željezo (0,042 %) i natrij (0,005 %). Koncentracija kofeina u zrnu kave iznosi 1-3 %, dok je u srebrnoj pokožici između 0,81- 1,37 % (Narita i Inouye, 2014.; Iriondo- DeHond i sur. 2020). Udio

ukupnih fenola se kreće od $5,80 \pm 0,06$ do $8,94 \pm 0,01$ mg GAE/g (Wen i sur., 2019). Količina sastojaka u srebrnoj pokožici kave varira ovisno o stupnju prženja zrna, sorti i geografskom području uzgoja kave.

2.2 PROTEINI

Proteini su makromolekule građene od velikog broja aminokiselina, čija relativna molekulska masa iznosi između 10000 i 1000000. Uz nukleinske kiseline smatraju se najvažnijom grupom visokomolekulskih prirodnih spojeva. Aminokiseline se povezuju peptidnim vezama u kraće peptidne lance ili duže nerazgranate polipeptidne lance odnosno proteine. Svaka aminokiselina je građena od ugljikova atoma na koji je vezana amino grupa, karboksilna skupina, određena bočna skupina (R) i vodikov atom (slika 3). Poznato je dvadeset aminokiselina koje najčešće grade proteine i dijele se prema funkcionalnim grupama; aminokiseline čiji je pobočni lanac čisti ugljikovodik, polarne aminokiseline, kisele aminokiseline i bazične aminokiseline. Aminokiseline su označene međunarodnim kraticama kako bi lakše komunicirali: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val (Karlson, 1993).

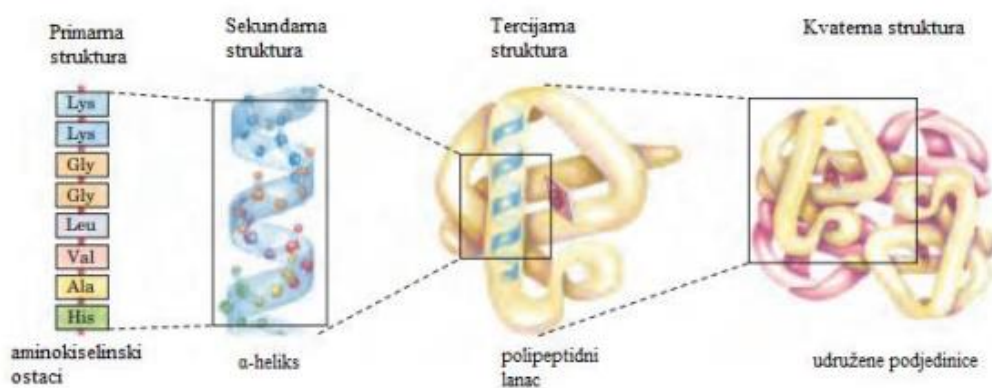


Slika 3. Osnovna strukturna formula aminokiselina (Berg i sur., 2002)

2.2.1 Građa proteina

Ugljikov atom koji se nalazi u središtu tetraedra je kiralan, osim kod aminokiseline glicin. Stoga aminokiseline mogu biti L ili D stereoizomeri. Proteini prirodnog podrijetla su uglavnom građeni od L-aminokiselina. Zbog prisutnosti amino i karboksilne skupine koje su nabijene, slobodne aminokiseline u otopini pri neutralnom pH se ponašaju kao dipolarne molekule tzv. Zwitter ioni. Proteini dolaze u četiri različite strukture (slika 4). Primarna struktura proteina je slijed sastavnih aminokiselina i prostetičkih skupina. Sekundarna i tercijarna struktura proteina

podrazumijeva trodimenzionalnu usmjerenost makromolekule. Sekundarna struktura opisuje odnose susjednih skupina (α - uzvojnica, β - nabrana ploča), dok tercijarna opisuje nabiranje proteina. Struktura proteina se može narušiti tijekom zagrijavanja, promjene pH vrijednosti, mehaničkim pritiskom, taj proces se naziva denaturacija (Pine, 1994).



Slika 4. Prikaz četiri strukturne razine proteina (Nelson i Cox, 2005)

2.2.2 Podjela proteina

Prema funkciji proteine dijelimo na skleroproteine, globularne proteine i proteinske komplekse. Skleroproteini su fibrilarne strukture i netopljivi su u vodi. Služe kao potporni elementi stanici tj. daju strukturu i čvrstoću, ali ne vežu ligande. Globularni proteini su kuglaste molekule, topljive u vodi ili razrijeđenim otopinama soli. Njihova funkcija je da provode reakcije proteina i liganda; sudjeluju kao enzimi i transporteri. Proteinski kompleksi su građeni od proteinskog dijela i prostetske skupine. Njihovi predstavnici su glikoproteini, lipoproteini, fosfoproteini i metaloproteini koji imaju specifične funkcije. Metode koje se primjenjuju prilikom izolacije i pročišćavanja proteina su elektroforeza, različite vrste kromatografije i ultracentrifugiranje.

2.2.3 Proteini u srebrnoj pokožici kave

Kako bi se izolirani proteini ukomponirali u određenu namirnicu potrebno je provesti aminokiselinsku analizu proteina. Prema istraživanju koje su proveli Zhang i sur. (2021) koncentracija slobodnih aminokiselina u ekstraktu SPK iznosi 0,58 mg/g, dok je koncentracija ukupnih aminokiselina 85 mg/g. U ekstraktu su prisutne aminokiseline koje su zaslužne za

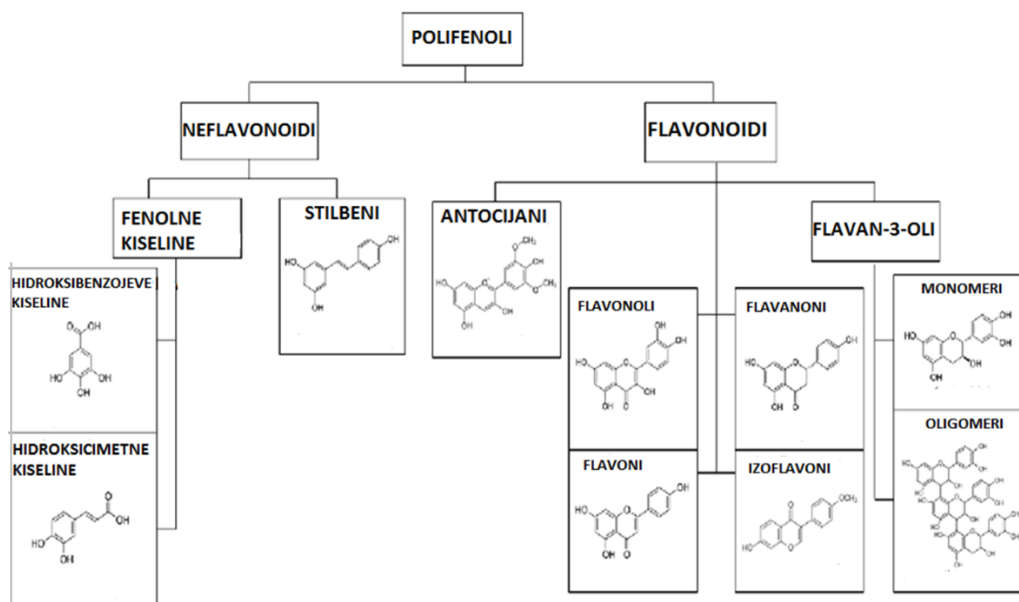
prijenos umami okusa; Asp i Glu. One ponekad nisu poželjne i kao idealno otapalo za ekstrakciju ne-umami aminokiselina se pokazala voda (Hildebrand i sur., 2020).

2.3 POLIFENOLI

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji posjeduju biološku aktivnost. Biljkama služe kao obrambene molekule od ultraljubičastog (UV) zračenja ili patogena, za rast i razmnožavanje te kao pigmenti. Izrazito su važna skupina za farmaceutsku, prehrambenu i kemijsku industriju. Njihovo najvažnije svojstvo je da djeluju kao antioksidansi, odnosno vežu slobodne radikale na sebe, donirajući vodikov atom ili elektron. Utječu na senzorska i nutritivna svojstva hrane. Povoljno utječu na zdravlje ljudi, stoga su sve češći predmet istraživanja. Smanjuju oksidativni stres koji utječe na razvoj karcinoma, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa tipa 2, Alzheimerove bolesti i Parkinsonove bolesti. Kemijska struktura polifenola sadrži konjugirane aromatske ili benzenske prstene na kojim je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (Balasundram i sur., 2006).

2.3.1 Podjela polifenola

Polifenoli obuhvaćaju veliku skupinu bioaktivnih spojeva, koje klasificiramo kao flavonoide i ne-flavonoide (slika 5). Flavonoidi su skupina spojeva koja sadrži petnaest ugljikovih atoma, raspoređenih unutar dva aromatska prstena povezanih s piranskim prstenom. Dijelimo ih na flavone, flavanole, flavan-3-ole, izoflavone, flavanone i antocijanidine. Ne-flavonoidi su spojevi koji se sastoje od jednog benzenskog prstena. Predstavnici ove skupine su fenolne kiseline, stilbeni i lignani.

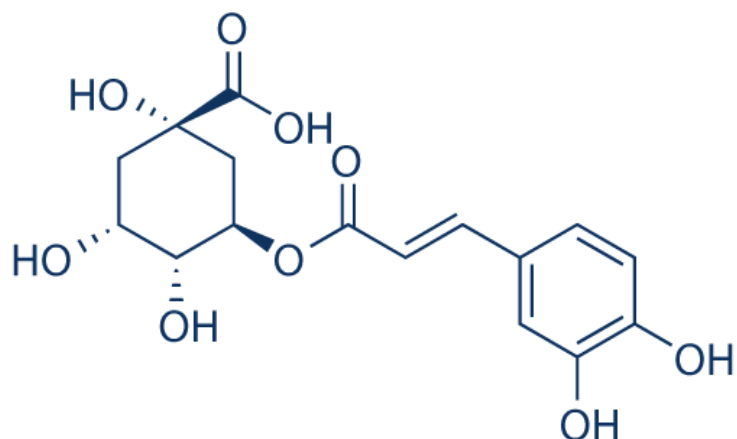


Slika 5. Podjela polifenola (Rasines- Perea i Teissedre, 2017)

Mehanizam djelovanja polifenola se temelji na vezanju slobodnih radikala ($R\bullet$) dovodeći do stabilnijeg i manje reaktivnog oblika, pri čemu se oni sami oksidiraju (Irina i dr., 2012). Nastali oksidirani radikal ($O\bullet$) se rezonancijski stabilizira, a nespareni elektron postaje delokaliziran po cijelom aromatskom prstenu.

2.3.2 Polifenoli prisutni u srebrnoj pokožici kave

Vodeni i alkoholni ekstrakt SPK je bogat bioaktivnim polifenolima. Pronađene su određene koncentracije fenolnih kiselina (galna kiselina, vanilna kiselina), flavonola (kvercetina, hiperozida, rutina), flavanona (naringina), flavan-3-ola ((+)-katehin) te antocijanidina (cijanidin-3-glukozid). No, analizom je utvrđena prisutnost i drugih bioaktivnih spojeva poput 5-kafeoilkvinske kiselina i derivata klorogenske kiseline (Narita i Inouye, 2013). Polifenoli izolirani iz SPK imaju velik potencijal u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Posebice klorogenska kiselina koja se pokazala kao odlično sredstvo u borbi protiv preranog starenja kože uzrokovanog UV zračenjem (slika 6). Mehanizam djelovanja je da potiskuje ekspresiju metaloproteinaze matriksa i potencijalno pojačava sintezu prokolagena u fibroblastima izazvane UV zračenjem (Cho i sur., 2017). Također, ekstrakt SPK ima potencijal za upotrebu u kozmetičkim proizvodima za smanjenje proizvodnje unutarstaničnih reaktivnih kisikovih spojeva u keratinocitima i poboljšanje zdravlja kože, koja je rezultat sinergijskog djelovanja različitih antioksidansa u ekstraktu SPK (Iriundo- DeHond i sur., 2016).



Slika 6. Klorogenska kiselina (Jaiswal i Kuhnert, 2010)

2.4 ULTRAZVUK

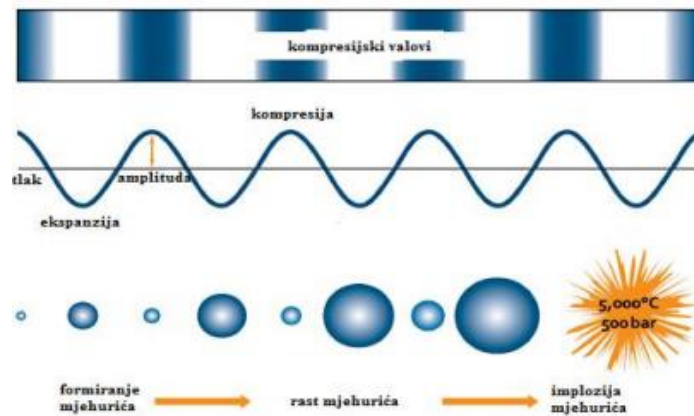
Ultrazvuk definiramo kao dio zvučnog spektra čija je frekvencija viša ili jednaka 20 kHz te ju ljudsko uho ne može detektirati (Jayasooriya i sur., 2004). Zvučni val karakterizira amplituda (A), frekvencija (f), valna duljina (l) i koeficijent prigušenja (α) koji ovisi o svojstvima materija kroz koji ultrazvuk prolazi.

Ultrazvuk svrstavamo u dvije kategorije: niske i visoke snage, a razlikuju se prema gustoći energije zvuka (W cm^{-3}), snazi (W) i intenzitetu zvučnih valova (W m^{-2}) (Ercan i Soysal, 2013). Ultrazvuk niske energije i niskog intenziteta (nižeg od 1 W cm^{-2}), ali visoke frekvencije (1-10 MHz) koristi se u dijagnostici. Jer ne uzrokuje fizikalna i kemijska oštećenja materijala kroz koji prolaze (Herceg i sur., 2009). No, ultrazvuk visoke energije i visokog intenziteta (višeg od 1 W cm^{-2}), ali niske frekvencije (20-100 kHz) uzrokuje fizička, mehanička, kemijska i biokemijska oštećenja materija kroz koji prolazi.

2.4.1 Mehanizam djelovanja ultrazvuka

Ultrazvuk visoke snage nastaje tako da ultrazvučni pretvarač pretvara električnu ili mehaničku energiju u energiju zvuka. Prolaskom ultrazvučnog vala kroz medij nastaju longitudinalni valovi i dolazi do stvaranja područja promjenjivih kompresija i ekspanzija mjehurića. Nastaju

milijuni mikroskopskih mjehurića koji se proširuju pod utjecajem negativnog tlaka, a zatim naglo implodiraju pod utjecajem pozitivnog tlaka ta se pojava naziva kavitacija. Nastali mjehurići su ispunjeni plinom ili parom i kada se podvrgnu nepravilnim oscilacijama dolazi do prsnuća tog mjehurića. Pritom dolazi do stvaranja regija vrlo visoke temperature (5500 K) i tlakova (100 MPa) (slika 7) što dovodi do promjena fizikalno-kemijskih svojstava lokalnih molekula (Leighton, 2007).



Slika 7. Usporedba ciklusa kompresije i ekspanzije sa formiranjem, rastom i implozijom kavitacijskog mjehurića (Šimić, 2015)

Najvažniji faktor koji dovodi do pojave kavitacije je frekvencija. Svojstva proizvoda kao što su viskoznost medija, gustoća, površinska napetost, prisutnost otopljenih plinova i slično utječu na pojavu kavitacije. Dok je temperatura obrnuto proporcionalna. Stoga, svaka tekućina ima karakterističnu temperaturu pri kojoj kavitacija ima najveću aktivnost, što dovodi do poprilično ograničenog raspona temperature (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Kavitacija uzrokuje depolimerizaciju koja je u određenim procesima poželjna; smanjenju viskoznosti. Istraživanja su pokazala kako primjenom ultrazvuka dolazi do smanjenja viskoznosti bez promjene u kemijskog strukturi polimernih lanaca. Novija istraživanja su pokazala da ultrazvuk visokog intenziteta utječe na strukturu i funkcionalna svojstva različitih polisaharida (Kardos i sur., 2001). No, primjena ultrazvuka visokog intenziteta može imati negativne posljedice, stvarajući slobodne radikale. Prilikom optimizacije primjene ultrazvuka potrebno je uzeti u obzir intenzitet ultrazvuka, temperaturu, vremenski interval i druge parametre (Režek Jambrak i sur., 2010).

2.4.2 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. *Ultrasound-assisted extraction, UAE*)

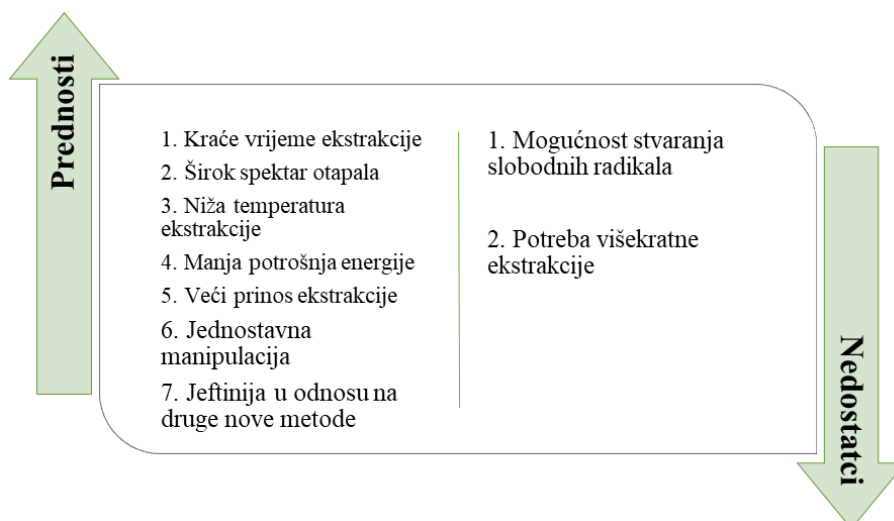
Sve je veći fokus na ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom zbog svojih benefita. Pod pojmom ekstrakcija podrazumijevamo tehnološku operaciju potpunog ili djelomičnog odjeljivanja tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima. Dolazi do prijenosa mase tvari odnosno otopljene tvari prelaze iz namirnice u otapalo i ona se odvija u tri koraka: željena komponenta se otapa u otapalu, smjesa otapala i otopljene tvari prelazi iz namirnice na površinu, otopljena tvar je raspršena u otapalu (Tiwari, 2015).

Ultrazvučna ekstrakcija djeluje na principu kavitacije. Implozija kavitacijskog mjehurića uzrokuje oštećenja matrice materijala na granici čvrste i tekuće faze te dolazi do erozija materijala. Prilikom implozije stvaraju se mikro-mlazovi koji uz visok tlak i temperaturu uništavaju staničnu stijenku. Kavitacija uzrokuje bubrenje stanica i probijanje staničnih stijenki, čime se omogućava brža difuzija i ispiranje komponenti iz stanice. Rezultat toga je brža i efikasnija ekstrakcija. Cilj primjene ultrazvučne ekstrakcije je povećati prinos željenih komponenti, a smanjiti vrijeme ekstrakcije, reducirati korištenje otapala, reducirati nastanak slobodnih radikala, a da se pritom očuvaju prirodna svojstva materijala. Pojednostavljena je manipulacija i obrada, krajnji produkt je znatno veće čistoće te ne zahtjeva naknadnu obradu otpadnih voda jer su korištena „zelena otapala“. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom troši samo dio fosilne energije koja se inače koristi u konvencionalnim metodama ekstrakcije poput Soxhleta, maceracije ili destilacije vodenom parom (Chemat i sur., 2011).

Uređaji koji se primjenjuju za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom predstavljaju jednu od ključnih uloga u vođenju procesa. Uz njihovu pomoć moguće je kontrolirati glavne parametre procesa kao što su gustoća zvučne energije, snaga, intenzitet i način rada (Tiwari, 2015). Ultrazvučni uređaji dolaze u obliku dvije izvedbe; ultrazvučna kupelj i ultrazvučna sonda. Ultrazvučna kupelj generira ultrazvuk pomoću niza ultrazvučnih pretvarača koji se mogu nalaziti ispod dna spremnika ili sa strane spremnika ili u obliku kutija s pojedinačnim pretvaračima. Pretvarači u ultrazvučnoj kupelji imaju veliku površinu i mogu se pričvrstiti na dno ili stranice spremnika čime bi se dodatno povećala površina koja će vibriranjem generirati zvučni val u medij spremnika. Stoga je nastala zvučna energija niskog intenziteta. Za razliku od kupelji ultrazvučna sonda se uranja u otapalo i vrši direktnu distribuciju ultrazvuka u mediju. Pritom su gubici energije svedeni na minimum, ultrazvučne sonde znatno su manje površine i generiraju valove većeg intenziteta. Prilikom odabira uređaja treba uzeti u obzir vrstu sonde i dizajn reaktora koji mogu utjecati na uspješnost ekstrakcije (Azmir i sur., 2013).

U industriji ultrazvučna ekstrakcija se primjenjuje za izolaciju polifenola, antocijana, aromatskih tvari, polisaharida, pigmenata, ulja i funkcionalnih spojeva. No, kako bi se povećala njena primjena u industriji potrebno je zajamčiti njenu sigurnost, održivost, isplativost i ekološku prihvatljivost (Chemat i sur.,2017). Prednost primjene ove metode je što se mogu koristiti vodene otopine odnosno tzv. „zelena otapala“ koja su sigurnija i ekološki prihvatljivija od dosadašnjih organskih otapala. Najčešća „zelena otapala“ su voda, terpeni, biljna ulja, agrootapala, superkritični fluidi, ionske kapljevine, prirodna eutektička otapala i slično. Spomenuta metoda se pokazala izvrsnom kada se radi o skupim sirovinama jer je ekonomičnija; veći je prinos i kraće vrijeme ekstrakcije (Radojčić Radovniković, 2020).

Na uspješnost ekstrakcije utječu fizikalni i kemijski parametri. Parametri poput amplitude, snage i gustoće ultrazvučnih valova karakteristični su za različite ultrazvučne uređaje. Visoka amplituda ili snaga povoljno utječu na ekstrakciju. No, ukoliko je amplituda previsoka dolazi do negativnog utjecaja na pretvarač ultrazvučnog uređaja, povećavajući agitaciju i smanjujući kavitaciju. Potrebno je biti oprezan tijekom odabira optimalne amplitude, jer povećanje amplitude ne povećava razinu kavitacije. Kod viskoznih uzoraka je potrebno povećati amplitudu jer dolazi do smanjenja učinka uzrokovanog mehaničkim vibracijama uređaja. Također, povećanje frekvencije uzrokuje smanjenje razine kavitacije, kavitacijski mjehurići nastaju tijekom ciklusa kompresije i ekspanzije. Ukoliko je frekvencija previsoka, vremenski interval između ciklusa je prekratak i sprječava rast mjehurića. Na uspješnost ekstrakcije utječu kemijska svojstva otapala odnosno uzorka, poput topljivosti i stabilnosti ciljanih spojeva u određenom otapalu. Osim već spomenutih parametara, na uspješnost ekstrakcije utječu temperatura, vrijeme trajanja tretmana, veličina čestica i slično (Chemat i sur., 2017; Wen i sur., 2018). UAE se uspješno primjenjuje za izolaciju različitih bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala. Istraživanja su pokazala kako se primjenom ove vrste ekstrakcije znatno smanjilo vrijeme ekstrakcije, količina upotrijebljenog otapala i potrošena energija za provedbu ekstrakcije, dok se prinos ekstrakcije znatno povećao u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju (Pan i sur., 2011). Prednosti i mane primjene ekstrakcije potpomognute ultrazvukom prikazane su na slici 8.



Slika 8. Prednosti i mane UAE (Chemat i sur., 2017)

2.4.3 Primjena ultrazvuka u prehrambenoj tehnologiji

Zbog širokog spektra primjene ultrazvuka, sve je prisutniji u prehrambenoj industriji. Stoga se ultrazvuk visokog intenziteta (20-100 kHz) koristi za čišćenje, otplinjavanje tekućina kao što su gazirana pića prije punjenja u boce, homogenizaciju tekućina, sušenje, omekšavanje mesa jer dolazi do prekida integriteta mišićnih stanica, ekstrakciju, emulgiranje, destilaciju, kristalizaciju, sterilizaciju, pasterizaciju, filtriranje jer dolazi do povećanja protoka, protiv pjenjenja jer valovi trenutno razbijaju mjehuriće, rezanje lomljivih namirnica, zamrzavanje, odmrzavanje, ekstrudaciju, depolimerizaciju (Chemat i sur., 2011; Schneider i sur., 2009).

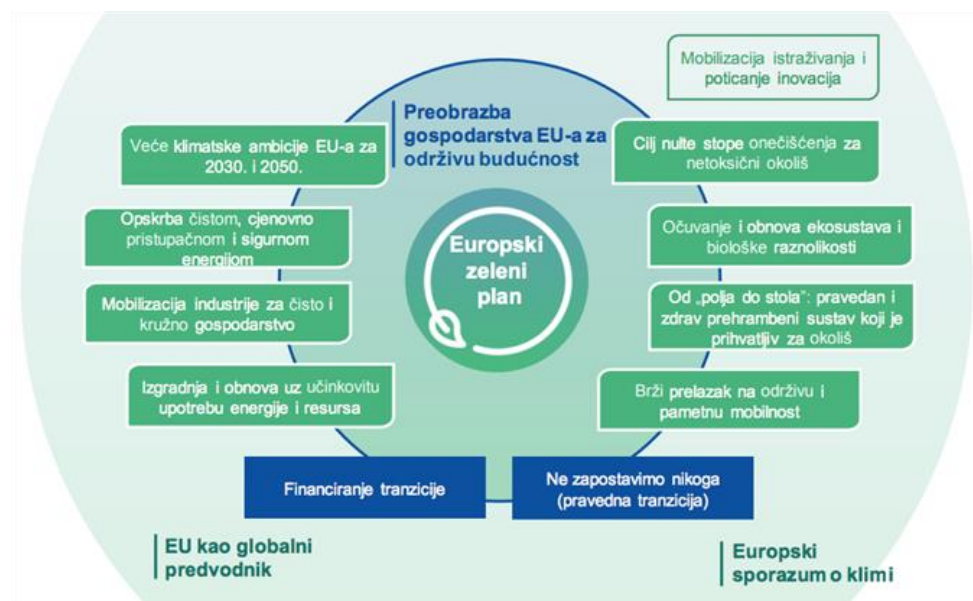
S obzirom da je ultrazvuk niskog intenziteta manje razoran koristi se kao analitička metoda za kontrolu obrade hrane, mjerenje teksture, sastava, viskoznosti, brzina protjecanja, kontrolu pakiranja, određivanje razine kapljevine u bačvama ili tankovima, koncentracija tvari u hrani (Režek Jambrak i sur., 2010).

2.5 ODRŽIVI RAZVOJ

Termin održivi razvoj je sve prisutniji u svakodnevnoj komunikaciji. Posljedice klimatskih promjena vidljivije su nego ikad. Stoga je potrebno poduzeti što konkretnije mjere kako bi se razmjeri budućih katastrofa što više ublažili. „*Održivi razvoj je okvir za oblikovanje politika i strategija kontinuiranog gospodarskog i socijalnog napretka, bez štete za okoliš i prirodne izvore bitne za ljudske djelatnosti u budućnosti. On se oslanja na ambicioznu ideju prema kojoj razvoj ne smije ugrožavati budućnost dolazećih naraštaja trošenjem neobnovljivih izvora i*

dugoročnim devastiranjem i zagađivanjem okoliša. Osnovni je cilj osigurati održivo korištenje prirodnih izvora na nacionalnoj i međunarodnoj razini“ (Odras, 2020). Održivi razvoj je orijentiran na tri segmenta, a to su gospodarska učinkovitost, društvena odgovornost i zaštita okoliša. Društvo ovisi o Zemljinim resursima, ekonomijom upravljaju ljudi, dok i ona sama ovisi o prirodi. Sva tri segmenta su međusobno isprepletana i nalaze se u određenoj korelaciji.

Europska komisija ulaže velike napore kako bi realizirala što više ciljeva održivog razvoja. Hrvatska kao članica Europske unije prihvatila je ciljeve strategije Ujedinjenih naroda (UN) održivom razvoju propisane „Agendom 2030“. Strategija uključuje 17 ciljeva koje je potrebno realizirati do 2030. godine na području klimatskih promjena, gospodarstva, društva, kvalitete života i političkih pitanja. Strategije održivog razvoja koje su više orijentirane na prehrambenu industriju su „Zeleni plan“ i „Od polja do stola“. Čiji su ciljevi osim smanjenja emisije stakleničkih plinova, poticaj korištenja obnovljivih izvora energije te različitih metoda sprječavanja klimatskih promjena, oblikovati pravedan i zdravi prehrambeni sustav koji je prihvatljiv za okoliš (EC, 2019) (slika 9).



Slika 9. Ciljevi Europskog zelenog plana (EC,2019)

Principi održivog razvoja u prehrambenoj industriji poznati su kao „zelena tehnologija“ koja podrazumijeva primjenu ekološki prihvatljivih metoda i kemikalija te maksimalno iskorištavanje sirovina i procesa kako bi nastalo što manje otpada. Porastom svijesti o važnosti očuvanja okoliša, promijenili su se afiniteti potrošača prema kvalitetnim i nutritivno bogatijim namirnicama. Pred industrijom su brojni izazovi jer je potrebno proizvesti zdravstveno ispravnu hranu, nutritivno vrijednu, ukusno i organoleptički što sličniju sirovoj neprerađenoj

hrani. Objedinjeni naziv za takvu hranu je “minimalno procesirana hrana”. U tu svrhu koriste se brojne netoplinske metode u obradi hrane; ultrazvuk, obrada visokim tlakom, pulsirajućim električnim i magnetskim poljem (Lelas, 2006).

Kako bi se smanjila proizvodnja otpada u industriji potrebno je iskoristiti sve nusprodukte tehnološkog procesa. Veliki potencijal leži u brojnim nusproduktima koji su završavali kao otpad. S nutritivnog stajališta često su bogat izvor različitih makro- i mikronutrijenata. U tehnološkom procesu proizvodnje kave nastaje znatna količina otpada, čak 90 % bobice završava kao otpad kojeg čini ljuska, parenhim, sloj sluzi, srebrna pokožica te talog kave nakon pripreme napitka (Iriondo-DeHond i sur., 2020). Zastupljenost određenog nusprodukta ovisi o tehnološkom procesu. Ljuska sadrži znatnu količinu antocijana i prehrambenih vlakana, trenutno se koristi kao kompost za biljke u zemljama podrijetla. No, u budućnosti se može koristiti za proizvodnju biogoriva, enzima, stočne hrane, proizvodnju brašna bogatog vlaknima i polifenolima te proizvodnju prehrambenih vlakana koja bi služila kao dodaci (Gouvea i sur., 2009, Murthy i sur., 2009, Velez i sur., 2015). Najpoznatiji proizvod od ljuske je čaj „Cascara čaj“ bogat polifenolima i antioksidansima (Heeger i sur., 2016). Sloj sluzi je izvor pektina, antioksidansa i flavonoida. Zbog određenog udjela sadržaja šećera može se koristiti kao zaslađivač u ljudskoj prehrani koji povoljno utječe na jačanje imuniteta (Velez i sur., 2015, Natucafe, 2021). Parenhim sadrži prehrambena vlakna koja se primjenjuju u proizvodnji niskokalorične i hipoglikemijske funkcionalne hrane (Benitez i sur., 2019). SPK je izvor prehrambenih vlakana, proteina i polifenola. Prehrambena vlakna se koriste u proizvodnji kruha i keksa (Pourfarzad i sur., 2013). Talog kave može se koristiti za proizvodnju dodataka prehrani, kao izvor prehrambenih vlakana, te za proizvodnju hrane za životinje, biogoriva, bioetanola, kozmetike (Lopez- Barrera i sur., 2016; Marto i sur., 2016; Rocha i sur., 2014; Martinez- Saez i sur., 2017). Istraživanja su pokazala kako je talog kave odlična sirovina za proizvodnju biogoriva i etanola, prinosi procesa doseže do 78 % (Woldesenbet i sur., 2016). Godišnje će se od 5 817 500 tona taloga kave u budućnosti moći proizvesti oko 700 000 t biogoriva, što je odlična vijest s obzirom na trenutnu potrošnju naftnih derivata (Park i sur., 2016).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio rada se sastoji od tri dijela. U prvom dijelu istraživanja provedena je ekstrakcija iz srebrne pokožice kave pri određenim uvjetima, te je spektrofotometrijski određen maseni udio proteina i polifenola iz ekstrakta. Tijekom drugog dijela istraživanja optimizirani su uvjeti UAE za izolaciju proteina i polifenola iz pokožice kave. Dok je u trećem dijelu istraživanja, provedena analiza aminokiselina ekstrakta dobivenih optimalnih uvjetima UAE.

3.1 MATERIJAL

3.1.1 Pokožica kave

U istraživanju su korišteni uzorci dobiveni od hrvatske tvrtke za proizvodnju kave, čaja i snack proizvoda iz Zagreba, Franck d.d. Uzorci sadrže mješavinu kave lat. *C. arabica* i lat. *C. robusta* s obzirom na to da se u pogonu sakuplja nusproizvod iz svih pržionika, koji se zatim pretvara u brikete. Uzorci nusproizvoda dobiveni su u obliku briketa koji su se za potrebe istraživanja usitnjavali u prah radi lakšeg provođenja analiza. Na temelju prethodnog istraživanja (Wet i sur., 2019) pripremljeni uzorci sadrže 10,0000 g srebrne pokožice kave i deioniziranu vodu u omjeru 1:50 (w/ v). Analize uzoraka provedene su u dvije paralele.

3.1.2 Kemikalije i standardi

1. Destilirana voda (PBF, Zagreb, Hrvatska)
2. Aceton (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
3. Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
4. Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

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

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

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

otopiti i promiješati otopinu te nadopuniti odmjernu tikvicu do oznake destiliranom vodom.

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

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

7. Reagens C:

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

8. Galna kiselina, (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

9. AccQ•Fluor Reagent Kit, (Waters, Milford, SAD)

10. AccQ•Fluor Ultra Eluent A Concentrate, (Waters, Milford, SAD)

11. Acetonitrile (ACN), (VWR Chemicals, Radnor, SAD)

12. Amino acid standard H, (Waters, Milford, SAD)

13. Amonijev bikarbonat, (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

14. Fenol, (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

15. Gel filtrat ion standards, (BioRad, Hercules, SAD)

16. Klororovodična kiselina, (VWR Chemicals, Radnor, SAD)

17. Metanol, (Honeywell, Wabash, SAD)

18. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, (Merck, Burlington, SAD)

19. Natrijev deoksikolat, (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

20. Peptidi za kalibriranje instrumenta ProteoMass MALDI calibration kit, (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

21. Trietilamonij bikarbonat (1M), (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

22. Trifluorooktana kiselina (TFA), (Merck, Burlington, SAD)

23. Triklorooktana kiselina, (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

24. Tripsin, (Promega, Madison, SAD)

25. Tetrahidrofuran, (Merck, Burlington, SAD)

26. α -cijano-4-hidroksi-cimetna kiselina (CHCA), (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

3.1.3 Aparatura i pribor

Aparatura:

1. Centrifuga (Rotina 35, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka)
2. Analitička vaga (NBL-254i, Nimbus Analytical Balances, Oxford, SAD)
3. UV/VIS spektrofotometar (Lambda 25, PerkinElmer, Waltham, SAD)
4. Vortex tresilica (Dlab, MX-S, Peking, Kina)
5. Magnetska miješalica (Dlab, MS-H-S, Peking, Kina)
6. Ultrazvuk (Q700CA Sonicator, Qsonica, Newtown, SAD)
7. Autoflex Speed MALDI TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka)
8. Agilent 1260 Infinity, G1311B, Binary pump, Fluorescent detector (Agilent, Santa Clara, SAD)
9. Concentrator plus (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
10. Reacti-therm 3 Heat (Thermo Scientific, Waltham, SAD)
11. Synergy® Water Purification System (Merck Millipore, Burlington, SAD)

Pribor:

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

3.2 METODE

3.2.1 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Proteini i polifenolni spojevi su izolirani primjenom UAE na uzorcima pokožice kave. UAE ekstrakcija provedena je s uređajem Ultrasonic processor Q700, SAD (slika 10), uz primjenu deionizirane vode kao ekstrakcijskog otapala.



Slika 10. Ultrazvučni uređaj Q700 (Sonicator, 2021)

U prvom dijelu istraživanja provedena je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom pri variranim parametrima ekstrakcije: vrijeme (3, 6 i 9 min) i amplituda (50, 75 i 100 %) te temperatura nije smjela prijeći 40 °C (da se spriječi denaturacija proteina), čime je dobiveno 9 ekstrakta (tablica 2). Svaka ekstrakcija je provedena u duplikatima. Eksperimentalni dizajn je napravljen u softveru STATGRAPHICS Centurion (StatPoint technologies, Inc., VA 20186, USA). Eksperiment se sastoji od 18 pokusa, budući da je ekstrakcija provedena u duplikatima. Cilj dizajniranja eksperimenta je utvrdi statistički utjecaj svakog faktora. Stoga je organiziran u faktorijalnom dizajnu. Nezavisne varijable su: amplituda (A) i vrijeme tretiranja (B). Izlazne vrijednosti su udio ukupnih proteina i udio ukupnih polifenola.

U drugom dijelu istraživanja, provedeno je optimiranje uvjeta UAE putem softvera STATGRAPHICS kako bi se definirali optimalni uvjeti ekstrakcije pri kojima se postižu najviši prinosi polifenolnih spojeva i proteina. Prilikom toga provedena je analiza rezultata

primjenom metode odzivne površine (eng. *Response Surface Methodology*, RSM). S pouzdanošću od 95 %. Također, analizom varijanci (ANOVA) utvrđena je statistička značajna razlika ($p \leq 0,05$) između zavisnih i nezavisnih varijabli te međusobni odnos nezavisnih varijabli na zavisnu. Obzirom da se prilikom RSM metode najčešće ne može utvrditi oblik veze zavisnih i nezavisnih varijabli. Zbog toga se koristi polinom nižeg reda u odgovarajućem području nezavisnih varijabli, u obliku linearne funkcije nezavisnih varijabli. Iz dobivenih rezultata analize dobivano optimalne parametre UAE.

Tablica 2. Eksperimentalni dizajn optimiranja uvjeta UAE

OZNAKA UZORKA	AMPLITUDA [%]	VRIJEME [min]
U1	100	6
U2	75	6
U3	100	9
U4	50	9
U5	75	9
U6	75	3
U7	50	6
U8	100	3
U9	50	3

Postupak ekstrakcije:

U laboratorijsku čašu od 250 mL odvaži se $10 \pm 0,0001$ g uzorka osušene, usitnjene i prosijane srebrne pokožice kave koja se pomiješa sa 100 mL destilirane vode na sobnoj temperaturi (22 °C). U plastičnu posudu se stave kockice leda te mala količina hladne vode. Laboratorijska čaša s uzorkom se uroni u posudu s ledom i stavi u podnožje ultrazvučne sonde uređaja. Ultrazvučna sonda je smještena u zvučnoj izolacijskoj kutiji iz sigurnosnih razloga. Ultrazvučna sonda se uroni u sredinu uzorka na način da se nalazi oko 2 cm ispod površine uzorka. Također, u uzorak se uroni termo-članak pri čemu treba paziti da termo-članak ne dodiruje stijenku čaše i ultrazvučnu sondu kako bi dobili ispravnu temperaturu uzorka. Zatvore se vratašca izolacijske kutije. Na kontrolnom ekranu uređaja podese se odgovarajući parametri ekstrakcije (tablica 2). Tijekom trajanja tretmana važno je obratiti pažnju da temperatura

uzorka ne smije prijeći 40 °C. Također, tijekom tretiranja evidentirani su parametri snage, temperature i energije prikazani na kontrolnom ekranu uređaja. Kako bi se pratila promjena energije u intervalu od 15 sekundi tijekom trajanja tretmana te je izračunata ukupna promjena energije u određenom vremenu [1] obzirom na specifični toplinski kapacitet uzorka [2]. Dobiveni ekstrakt se filtrira preko Büchnerovog lijevka i prikuplja u falcon epruvete za daljnje analize.

Izračun ukupne promjene energije:

$$p = m \cdot c_p \cdot \frac{dT}{t} \quad /1/$$

gdje je:

p - ukupna promjena energije (J s⁻¹)

m - masa uzorka (g)

c_p - specifični toplinski kapacitet (J K⁻¹ g⁻¹)

dT - promjena temperature u točki T₁ i T₂ (K)

t - vremenski interval (s)

Izračun specifičnog toplinskog kapaciteta uzorka:

$$c_p = x_1 \cdot c_{p1} + x_2 \cdot c_{p2} + x_3 \cdot c_{p3} + x_4 \cdot c_{p4} + x_5 \cdot c_{p5} \quad /2/$$

gdje je:

c_p – specifični toplinski kapacitet uzorka (J K⁻¹ g⁻¹)

x_n - udio određenog sastojka

c_{pn} - specifični toplinski kapacitet sastojka (J K⁻¹ g⁻¹)

3.2.2 Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola

Princip određivanja:

Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva provodi se u vodenom ekstraktu primjernom spektrofotometrijske metode. Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline, reagira s fenoksid-ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenih volframovih i molibdenovih oksida. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014) sa spektrofotometrom (Lambda 25, UV/VIS spektrofotometar). Intenzitet obojenja je direktno proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku.

Priprema uzorka:

Dobiveni ekstrakt je potrebno 2 puta razrijediti s vodom prije postupka određivanja ukupnih polifenola.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu redom se otpipetira 0,1 mL, 7,9 mL destilirane vode te 0,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa koji je prethodno razrijeđen s vodom u omjeru 1 : 2. Promiješa se i doda 1,5 mL 20 %-tne otopine natrijeva karbonata (Na_2CO_3). Sadržaj epruvete se ponovno dobro promiješa na Vortex uređaju. Pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu (slika 11). Slijepa proba se pripremi na isti način kao i ispitivani uzorci, ali se pritom umjesto uzorka u reakciju smjesu dodaje 0,1 mL destilirane vode.

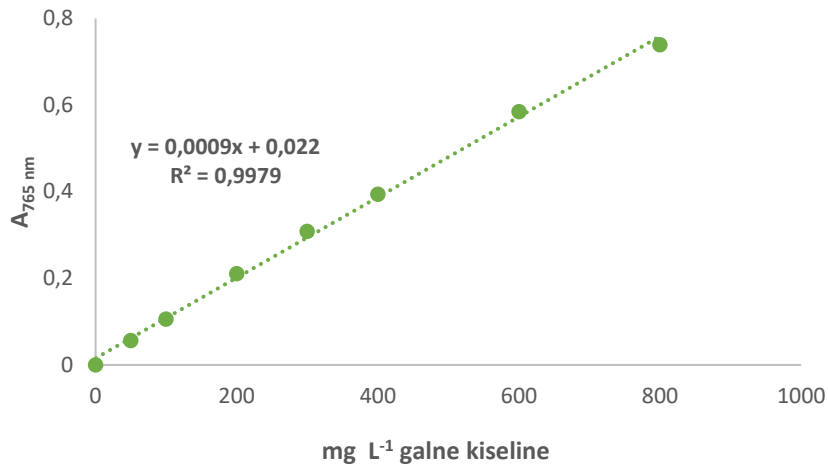


Slika 11. Uzorci SPK u kojima se razvilo plavo obojenje (vlastita fotografija)

Izrada baždarnog pravca za određivanje ukupnih polifenola:

Iz osnovne otopine standarda galne kiseline koncentracije 1000 mg L^{-1} , u odmjerne tikvice od 50 mL pripreme se sljedeća razrjeđenja: 50, 100, 200, 300, 400, 600 i 800 mg L^{-1} .

Ponovi se prethodno opisani postupak reakcije s Folin-Ciocalteu reagensom s time da se umjesto uzorka u reakcijsku smjesu dodaje $0,1 \text{ mL}$ pripremljenih razrjeđenja galne kiseline. Nakon 2 sata se izmjeri apsorbancija uzoraka na 765 nm . Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apscisu nanose koncentracije galne kiseline (mg L^{-1}), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm (slika 12). Koncentracija ukupnih polifenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 12. Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0009x + 0,022 \quad (R^2 = 0,9979) \quad /3 /$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm

X – koncentracija galne kiseline (mg L⁻¹)

R² – koeficijent determinacije

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

3.2.3 Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry- u

Princip određivanja:

Određivanje koncentracije proteina po Lowry- u provodi se u vodenom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrije. Reakcija se temelji na formiranju kompleksa iona bakra s peptidnim vezama: u lužnatim uvjetima ion bakra Cu²⁺ tvori kompleks s peptidnim vezama,

reducirajući se u Cu^+ . Dok se Folin-Ciocalteu reagensa reducira: aminokiselinski ostaci tirozina, triptofana i cisteina reagiraju s reagensom, pri čemu nastaje nestabilni produkt, a on se zatim reducira do molibden/volfram. Pri tome nastaje kompleks plavo-ljubičastog obojenja sa maksimum apsorbancije pri 740 nm.

Priprema uzorka:

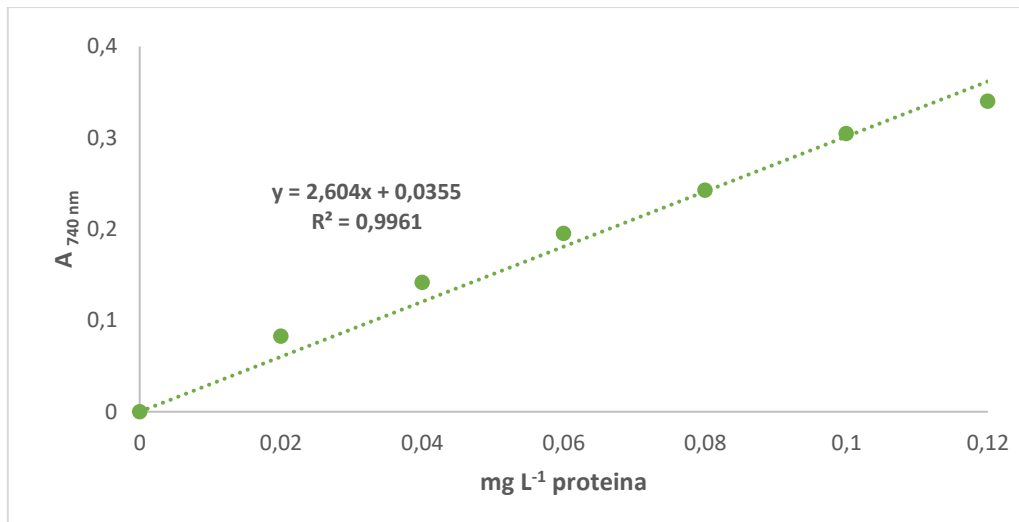
Uzorak je pripremljen na način da je otpipetirano 10 mL u Falcon epruvetu. Doda se 40 mL acetona kako bi se proteini istaložili. Falcon epruveta s uzorkom se pohrani u zamrzivač na 15 minuta pri $-18\text{ }^\circ\text{C}$. Zatim se uzorci temperiraju i centrifugiraju pri 10000 o/ 10 min. Supernatant se dekantiranjem odvoji od taloga. Talog se ispere s 10 mL acetona, te se naposljetku otopi u 10 mL destilirane vode. Prije određivanja koncentracije proteina uzorci su razrijeđeni 5 puta s destiliranom vodom.

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu se otpipetira 0,4 mL uzorka proteina i 2 mL reagensa C, promiješa se i inkubira na sobnoj temperaturi 10 do 15 minuta. Zatim se naglo doda 0.2 mL Folin- Ciocalteu reagensa uz snažno miješanje na Vortexu. Reakcijska smjesa se inkubira na sobnoj temperaturi 40 do 60 minuta. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 740 nm sa spektrofotometrom (Lambda 25, UV/VIS spektrofotometar). Na isti način se priprema slijepa proba, ali se umjesto uzorka uzima ekstrakcijsko otapalo tj. destilirana voda.

Izrada baždarnog dijagrama:

Iz standardne otopine proteina koncentracije 200 mg mL^{-1} , u odmjernu tikvicu od 10 mL pripreme se otopine poznate koncentracije 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1 i 0,12 mg/L. Ponovi se prethodno opisan postupak i izmjeri se apsorbancija uzoraka poznate koncentracije pri 740 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apscisu nanose koncentracije proteina (mg L^{-1}), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 740 nm (slika 13). Koncentracija proteina izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 13. Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 2,604x + 0,0355 \quad (R^2 = 0,9961) \quad /4/$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 740 nm

X – koncentracija proteina (mg L⁻¹)

R² – koeficijent determinacije

Koncentracije proteina izražene su u mg po L uzorka i kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.4 Analiza aminokiselina

Kvantitativna analiza aminokiselina provedena je koristeći metodu Waters AccQ•Tag prema uputama proizvođača (Waters), a obuhvaća hidrolizu, derivatizaciju aminokiselina s AccQ•Fluor derivatizacijskim reagensom te tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) kvantitativnu analizu.

3.2.4.1 Hidroliza

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

3.2.4.2 Derivatizacija

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

3.2.4.3 Kvantitativna HPLC analiza

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

Tablica 3. HPLC metoda korištena za kvantitativnu analizu aminokiselina.

Uvjeti kromatografske separacije	Kolona:	Waters AccQ•Tag, 3,9x150 mm		
	Volumen injekt. uzorka:	1 µL		
	Volumen injekt. standarda:	5 µL		
	Detekcija:	ekscitacija: 250 nm, emisija: 395 nm		
	Protok:	1,0 mL/min		
	Mobilna faza A:	Waters AccQ•Tag eluent A		
	Mobilna faza B:	Acetonitril / Milli-Q voda = 60/10 (v/v)		
	Temperatura kolone:	37 °C		
		Vrijeme (min)	% Mobilne faze A	% Mobilne faze B
		0,0	98,0	2,0
		0,5	98,0	2,0
		15,0	93,0	7,0
	19,0	90,0	10,0	
	28,0	74,0	26,0	
	35,0	67,0	33,0	
	36,0	67,0	33,0	
	37,0	0,0	100,0	
	45,0	0,0	100,0	
	46,0	98,0	2,0	
	52,0	98,0	2,0	
Standard	Derivatizirana mješavina aminokiselina (amino acid standard H mixture, Waters) u koncentraciji 100 pmol/µL			

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

Separacija proteina provedena je koristeći parametre opisane u tablici 4.

Tablica 4. SEC-HPLC metoda korištena separaciju proteina na temelju veličine.

Uvjeti kromatografske separacije	Kolona:	3 μ m, 4,6 x 300 mm, BioSec-3, Agilent	
	Volumen injekt. uzorka:	10 μ L	
	Volumen injekt. standarda:	5 μ L	
	Detekcija:	215	
	Protok:	0,3 mL/min	
	Mobilna faza A:	145 mM NaH ₂ PO ₄ , pH=7.0	
	Temperatura kolone:	20 °C	
	Ispiranje:	Izokratno	
Standard	Mješavina poznatih proteina korištena za određivanje uzoraka.		
	Protein	Mješavina poznatih proteina (kDa)	RT (min)
	tireoglobulin	670	6,890
	γ -globulin	158	
	ovalbumin	44	7,538
	mioglobulin	17	8,268
Vitamin B12	1.35	12,226	

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

3.2.6.1 Ekstrakcija proteina i taloženje

Na volumen od 1260 μ L uzorka dodano je 15 μ L 10 % vodene otopine natrijevog deoksikolata te 225 μ L 50 % vodene otopine trikloroctene kiseline. Proteini su taloženi na ledu tijekom 2 h te centrifugirani pri 10000 \times g tijekom 10 min pri 4 °C. Talog je ispran dva puta s ledenim tetrahidrofuranom. Naposljetku, talog je otopljen u 50 μ L 50 mM trietilamonijevog bikarbonata.

3.2.6.2 Elektroforeza

Separacija proteina provedena je koristeći Invitrogen™ Novex™ Tris-Glycine, 4 – 12 %, 1,5 mm gel prema uputama proizvođača. Nakon separacije proteini su vizualizirani Coomassie brilliant blue G250 bojom.

3.2.6.3 Digestija proteina u gelu

Digestija proteina u gelu provedena je prema protokolu opisanom u: Shevchenko i sur. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. Anal. Chem. 68, 850-858.

3.2.6.4 Analiza peptida spektrometrom masa

Analiza peptida provedena je uz pomoć spektrometra masa Autoflex Speed matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija- vrijeme leta (eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight*, MALDI-TOF/TOF) (Bruker, Njemačka) s parametrima opisanima u Prilogu 1 - Parametri masenog spektrometra (eng. *mass spectrometers*, MS) i MS/MS analize.

3.2.6.5 Identifikacija proteina

Nakon snimanja MS i MS/MS spektara dobiveni podaci su korišteni za pretragu baze podataka uz pomoć programa ProteinScape, verzija 3,0 (Bruker, Njemačka). Kreirana je *in house* baza podataka koja sadrži proteine lat. *Coffea canephora*. Korištene sekvence proteina preuzete su s UniProt baze podataka (26073 unosa, pristupljeno 26.02.2021.).

3.2.7 Statistička analiza

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav STATGRAPHICS 19 (Statgraphics Tehnologies, Inc., Virginia, SAD).

U eksperimentalnom dijelu istraživanja koji se odnosio na optimizaciju parametara ekstrakcije za izolaciju bioaktivnih spojeva iz srebrne pokožice kave nezavisne varijable su: vremenski interval tretiranja (3, 6 i 9 min) i amplituda (50, 75 i 100 %), a kao zavisne varijable su: udio ukupnih polifenola ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$) i udio ukupnih proteina ($\text{mg } \text{L}^{-1}$). Za usporedbu uzoraka korištena je analiza varijanci (ANOVA) kako bi se mogla utvrditi odstupanja u provedenim

tretmanima. Parametri su imali statistički značajan utjecaj ako je $p < 0.05$. Rezultati obrađeni u Statgraphics-u su prikazani putem metode odazive površine - RSM (eng. *Response Surface Methodology*). RSM obuhvaća skup statističkih i matematičkih metoda koje se primjenjuju za razvoj, poboljšanje i optimiranje procesa. Točnost kvadratnog empirijskog modela provjerena je analizom varijance (ANOVA) s razinom pouzdanosti od 95 %.

Rezultati analize aminokiselina i proteina su obrađeni pomoću Microsoft Office Excel 2013. programa.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U prvom dijelu eksperimentalnog istraživanja provedena je UAE ekstrakcija polifenola i proteina iz usitnjenog uzorka srebrne pokožice kave. Kao ekstrakcijsko otapalo korištena je deionizirana voda jer je jeftino, ekološki i tehnološki prihvatljivo otapalo, ujedno jedno od najčešćih otapala „Zelene kemije“. Spektrofotometrijskom analizom je utvrđen maseni udio ukupnih polifenola i proteina u uzorku. Dobiveni rezultati su obrađeni uz pomoć MS Excela programa i prikazani u obliku tablica kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja s pripadajućom standardnom pogreškom. Također, obrađeni su podaci evidentirani tijekom izvođenja UAE za svaki uzorak.

Zatim je provedeno optimiranje uvjeta UAE kao drugi dio eksperimentalnog istraživanja. Pritom su varirani parametri ekstrakcije: amplituda (50, 75 i 100 %) i vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 minuta) pri čemu temperatura ekstrakcijske smjese nije smjela prijeći 40 °C. Kako bi rezultati optimizacije bili što bolje prikazani statistički su obrađeni primjenom STATGRAPHICS-a te su prikazani grafički i tabelarno.

U posljednjem dijelu eksperimenta provedena je analiza proteina i aminokiselina uzoraka dobivenih optimalnim parametrima UAE. Rezultati su prikazani u obliku kromatograma i tablica.

4.1 Rezultati fizikalnih parametara tijekom izvođenja UAE

Tablica 5. Prosječne vrijednosti parametara praćenih tijekom izvođenja UAE

Uzorak	Vrijeme [min]	Amplituda [%]	Temperatura [°C]	Snaga [W]	Energija [J]	dT	Ukupna promjena [J s ⁻¹]*
U1	6	100	18,042 ± 0,235	68,236 ± 0,276	14256,514 ± 0,518	1,000±0,833	4,367±0,270
U2	6	75	18,542 ± 0,171	61,854 ± 0,114	12235,229±0,534	0,917±1,588	4,077±0,572
U3	9	100	20,185 ± 0,320	63,676 ± 0,324	19447,380±0,497	1,185±1,290	5,497±0,341
U4	9	50	17,111 ± 0,140	48,042 ± 0,075	13727,167±0,556	0,819±1,933	3,233±0,807
U5	9	75	19,852 ± 0,357	60,741 ± 0,177	18151,546±0,528	1,824±1,338	9,040±0,292
U6	3	75	22,375 ± 0,124	69,583 ± 0,018	6585,208±0,548	1,000±1,323	5,018±0,409
U7	6	50	21,639 ± 0,164	49,750 ± 0,045	9401,944±0,552	0,819±2,097	4,482±0,556
U8	3	100	25,875 ± 0,102	85,167 ± 0,032	8203,708±0,526	1,208±0,755	4,273±0,265
U9	3	50	20,639 ± 0,092	50,722 ± 0,031	4890,222±0,533	0,306±1,693	2,123±0,341

* masa uzorka iznosi 110 g, a specifični toplinski kapacitet uzorka iznosi 1,5114 J K⁻¹ g⁻¹

Podaci prikazani u tablici 5 su srednje vrijednosti praćenih vrijednosti temperature, snage i energije svakih 15 sekundi tijekom trajanja tretmana. Cilj spomenute analize je pratiti promjenu spomenutih parametara svakih 15 sekundi. Pratio se trend rasta snage, energije i temperature tijekom izvođenja UAE. Nadalje, izračunata je ukupna promjena energije s obzirom na vremenski interval (15 s), promjena temperature uzorka unutar tog intervala, specifični toplinski kapacitet SPK (izračunat na temelju njenog sastava) i mase uzorka. Iz rezultata vidimo kako tijekom najintenzivnijeg tretmana (U8) postizemo najvišu vrijednost energije

(19447,380±0,526 J). Dok je najniža vrijednost energije evidentirana kod uzorka U9 (4890,222±0,533 J). Oba rezultata su logična s obzirom na uvjete ekstrakcije i njihovu korelaciju. No, to nije pravilo za sve parametre pa je tako najviša snaga evidentirana kod uzorka U8 (85,167± 0,032 W), a najniža kod uzorka U4 (48,042±0,075W). Mogući izvor pogreške je postojanje nakupine u obliku aglomerata u pojedinim uzorcima. Ukoliko takav aglomerat dođe u blizinu ultrazvučne sonde, ona ga razbije ali pritom upotrijebi veću snagu nego li kod homogenog uzorka i evidentiramo netočnu vrijednost.

4.2 Utjecaj UAE na udio ukupnih polifenola

Tablica 6. Rezultati mjerenja masenog udjela ukupnih polifenola u uzorku SPK

Uzorak	Vrijeme [min]	Amplituda [%]	Ukupni polifenoli [mg EGK 100 g ⁻¹]
U1	6	100	483,9389 ± 0,03
U2	6	75	436,4833 ± 0,03
U3	9	100	456,8556 ± 0,03
U4	9	50	413,2278 ± 0,09
U5	9	75	525,6778 ± 0,03
U6	3	75	397,7167 ± 0,06
U7	6	50	386,9667 ± 0,03
U8	3	100	434,3278 ± 0,05
U9	3	50	375,5722 ± 0,05

U tablici 6 prikazani su rezultati mjerenja masenog udjela ukupnih polifenola nakon provedene UAE. Maseni udio ukupnih polifenola u uzorku SPK se kretao u rasponu od 375,5722 ± 0,05 mg EGK 100 g⁻¹ do 525,6778 ± 0,03 mg EGK 100 g⁻¹. Uzorak U5 koji je tretiran 9 minuta i amplitudom od 75 % pokazao je najveći maseni udio ukupnih polifenola (525,6778 ± 0,03 mg

EGK 100^{-1} g^{-1}). Nešto nižu vrijednost udjela ukupnih polifenola pokazao je uzorak U1 tretiran 6 minuta i amplitudom 100 % ($483,9389 \pm 0,03 \text{ mg EGK } 100 \text{ g}^{-1}$), uzorak U3 je pokazao nižu vrijednost od očekivanog, s obzirom da je tretiran najvišom amplitudom i najdužim vremenom pretpostavljalo se da će pokazati najvišu vrijednost udjela ukupnih polifenola. No, to se ipak nije dogodilo uzorak je tek treći u nizu ($456,8556 \pm 0,03 \text{ mg EGK } 100 \text{ g}^{-1}$). Dok je očekivano izmjerena najniža vrijednost kod uzorka U9 koji je podvrgnut tretmanu od 3 minute i amplitudi 50 % ($375,5722 \pm 0,05 \text{ mg EGK } 100 \text{ g}^{-1}$). Niža vrijednost masenih udjela polifenola uzoraka je rezultat lošeg odabira otapala. Istraživanja su pokazala kako je voda najlošije otapalo za ekstrakciju polifenola (Nzekoue i sur., 2020).

Wen i sur. (2019) su proveli UAE na uzorcima srebrne pokožice kave i utvrdili maseni udio ukupnih polifenola od $609 \text{ mg EGK } 100 \text{ g}^{-1}$ i $643 \text{ mg EGK } 100 \text{ g}^{-1}$ u vodenom ekstraktu, dok je udio ukupnih polifenola u otopini metanol-voda (80:20, v/v) iznosio $866 \text{ mg EGK } 100 \text{ g}^{-1}$ i $894 \text{ mg EGK } 100 \text{ g}^{-1}$. Izmjerene vrijednosti u netretiranim uzorcima iznosile su $582 \text{ mg EGK } 100 \text{ g}^{-1}$ (vodeni ekstrakt) i $810 \text{ mg EGK } 100 \text{ g}^{-1}$ (metanol-voda). No, parametri ekstrakcije su bili nešto drugačiji; primijenjen je ultrazvučni intenzitet od 5 W cm^{-2} i 38 W cm^{-2} , vrijeme tretiranja 10 minuta te amplituda od 20 i 100 % i omjerom krutina tekućina 1:50. Također, Panus i sur. (2017) su istraživali vodene ekstrakte SPK i utvrdili udjele ukupnih polifenola u rasponu od $435 \text{ mg EGK } 100 \text{ g}^{-1}$ do $1282 \text{ mg EGK } 100 \text{ g}^{-1}$. Oni su proveli ekstrakciju primjenom maceracije pri $60 \text{ }^\circ\text{C}$ kroz 30 minuta, u omjeru krute i tekuće faze 1:50, bez primjene ultrazvuka. U svom radu Zengin i sur. (2020) su došli do drugačijih rezultata koji se znatno razlikuju od svih prethodnih istraživanja. Izmjerali su udio polifenola u vodenom ekstraktu od $2049 \text{ mg EGK } 100 \text{ g}^{-1}$. U eksperimentu su koristili ultrazvučnu kupelj za provedbu UAE, frekvenciju od 40 kHz, vrijeme tretiranja kroz 120 minuta te temperaturu od $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Nadalje, Zhang i sur. (2021) su u svom istraživanju ustvrdili maseni udio ukupnih polifenola u vrijednosti od $286 \pm 0.08 \text{ mg EGK } 100 \text{ g}^{-1}$ što je znatno niže od rezultata našeg eksperimenta.

Prilikom provedbe ekstrakcije potrebno je obratiti pažnju na sve faktore koji mogu utjecati na uspješnost ekstrakcije. Kao što su izvedba uređaja za UAE, temperatura tretmana, vremenski interval tretiranja, vrsta otapala, ultrazvučni intenzitet, frekvencija i amplituda. U posljednje vrijeme, kolorimetrijske metode ne smatraju preciznom metodom za određivanje točnog kemijskog sastava uzorka. Naime, problem proizlazi iz činjenica da Folin-Ciocalteu reagens ne reagira samo s fenolima, već i nekim drugim spojevima pa na taj način dobiveni rezultati nisu u potpunosti reprezentativni za udjele fenola u ekstraktima (Sánchez- Rangel i sur., 2013).

Kao bi rezultati istraživanja bili što točniji, rezultate kolorimetrijskih metoda je potrebno provjeriti preciznijim metodama poput vezanog sustava tekućinska kromatografija visokog učinka - spektrometrija mase (eng. *High-performance liquid chromatography with mass spectrometry*, HPLC-MS/MS) i nuklearne magnetne rezonance (eng. *Nuclear magnetic resonance*, NMR).

4.2.1 Statistička obrada rezultata i optimiranje parametara

Tablica 7. Analiza varijanci za udio ukupnih polifenola

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F -omjer	p -vrijednost
A:amplituda	6623,8	1	6623,8	4,30	0,1299
B:vrijeme	5899,76	1	5899,76	3,83	0,1454
AA	1584,21	1	1584,21	1,03	0,3854
AB	57,2141	1	57,2141	0,04	0,8596
BB	7,21873	1	7,21873	0,00	0,9498
Ukupna pogreška	4626,57	3	1542,19	-	-
Ukupna (korelacija)	18798,8	8	-	-	-

R- kvadrantno= 75,389 %

R- kvadrantno (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 34,3706 %

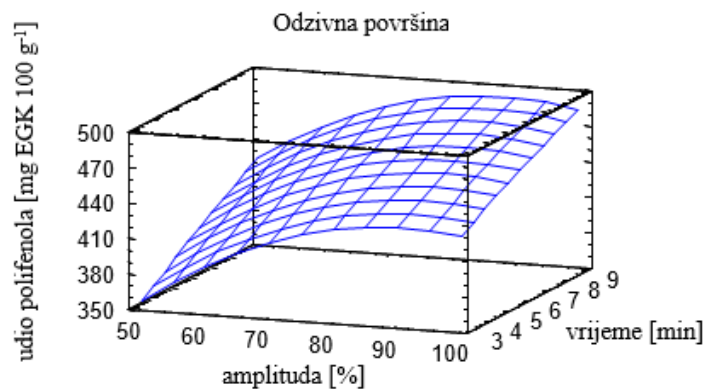
Standardna pogreška, procjena= 39,2707

Srednja apsolutna greška= 19,8987

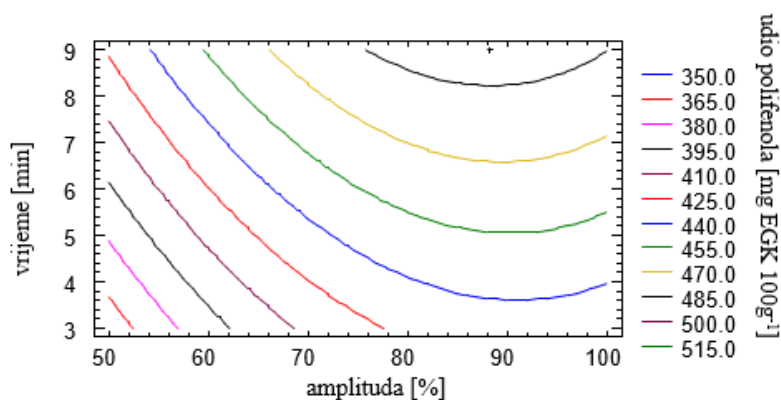
Durbin-Watson statistika = 2.17122 (p=0,7028)

Lag 1 rezidual autokorelacija = -0,190183

Tablica analize varijanci (ANOVA) dijeli varijabilnost udjela ukupnih polifenola za svaki od faktora. Rezultati analize varijanci za udio ukupnih polifenola (tablica 7) pokazuju kako promjena visine amplitude i vremenskog intervala nemaju značajan utjecaj na udio ukupnih polifenola ($p > 0,05$). Također, analizirani su međusobni odnosi nezavisnih varijabli na udio polifenola, nije uočen statistički značajan utjecaj ($p > 0,05$). Stoga prilikom dizajniranja modela ekstrakcije treba obratiti pažnju na utjecaj spomenutih parametara.



Slika 14. 3D dijagram odzivne površine za udio ukupnih polifenola



Slika 15. Konturni dijagram odzivne površine za udio ukupnih polifenola

Na slikama 14 i 15 su prikazani dijagrami odzivne površine za udio ukupnih polifenola iz kojih se može vidjeti kako vrijeme i amplituda nemaju statistički značajan utjecaj na udio polifenola, no primjećuje se kako vrijeme ipak utječe na prinos ekstrakcije. S duljim vremenom ekstrakcije, udio ekstrahiranih polifenola se povećavao. Pomoću ovih dijagrama možemo korigirati određene faktore u budućim istraživanjima, obzirom da se u spomenutim dijagramima najbrže zapaža odgovor za najmanju promjenu eksperimentalnih faktora.

Tablica 8. Polinom i predviđena vrijednost udjela ukupnih polifenola i rezultati optimizacije

	Polinom i predviđena vrijednost	Rezultati optimizacije																									
Udio ukupnih polifenola	$\text{udio polifenola} = 8.57589 + 8.38624 \cdot A + 16.7676 \cdot B - 0.0450309 \cdot A^2 - 0.0504267 \cdot A \cdot B - 0.211093 \cdot B^2$	Optimalna vrijednost																									
		<table border="1"> <thead> <tr> <th><i>Faktor</i></th> <th><i>Najniža</i></th> <th><i>Najviši</i></th> <th><i>Optimalan</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>amplituda</td> <td>50,0</td> <td>100,0</td> <td>88,09</td> </tr> <tr> <td>vrijeme</td> <td>3,0</td> <td>9,0</td> <td>9,0</td> </tr> </tbody> </table>	<i>Faktor</i>	<i>Najniža</i>	<i>Najviši</i>	<i>Optimalan</i>	amplituda	50,0	100,0	88,09	vrijeme	3,0	9,0	9,0													
	<i>Faktor</i>	<i>Najniža</i>	<i>Najviši</i>	<i>Optimalan</i>																							
	amplituda	50,0	100,0	88,09																							
	vrijeme	3,0	9,0	9,0																							
		<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2"></th> <th><i>Predviđeno</i></th> </tr> <tr> <th><i>Amplituda (%)</i></th> <th><i>Vrijeme (min)</i></th> <th><i>Udio polifenola (mg EGK 100 g⁻¹)</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>75,0</td> <td>6,0</td> <td>454,559</td> </tr> <tr> <td>76,0</td> <td>6,11698</td> <td>457,057</td> </tr> <tr> <td>77,0</td> <td>6,24223</td> <td>459,532</td> </tr> <tr> <td>78,0</td> <td>6,37722</td> <td>461,997</td> </tr> <tr> <td>79,0</td> <td>6,52386</td> <td>464,467</td> </tr> <tr> <td>80,0</td> <td>6,68472</td> <td>466,964</td> </tr> </tbody> </table>			<i>Predviđeno</i>	<i>Amplituda (%)</i>	<i>Vrijeme (min)</i>	<i>Udio polifenola (mg EGK 100 g⁻¹)</i>	75,0	6,0	454,559	76,0	6,11698	457,057	77,0	6,24223	459,532	78,0	6,37722	461,997	79,0	6,52386	464,467	80,0	6,68472	466,964	= 491,718 mg EGK 100 g ⁻¹
			<i>Predviđeno</i>																								
	<i>Amplituda (%)</i>	<i>Vrijeme (min)</i>	<i>Udio polifenola (mg EGK 100 g⁻¹)</i>																								
75,0	6,0	454,559																									
76,0	6,11698	457,057																									
77,0	6,24223	459,532																									
78,0	6,37722	461,997																									
79,0	6,52386	464,467																									
80,0	6,68472	466,964																									

*A- amplituda , B-vrijeme

Primjenom polinoma i predviđene vrijednosti dobiva se jasnija predodžba o trendu promjena u udjelu polifenola ukoliko se mijenja neki od faktora. Prilikom dizajniranja procesa se može predvidjeti okvirna vrijednosti udjela polifenola, što uvelike olakšava manipulaciju procesom, ovisno o željenim rezultatima. Rezultati optimizacije pokazuju optimalnu amplitudu od 88,09 % i optimalno vrijeme 9 minuta (tablica 8). A pri tome optimalna vrijednost udjela ukupnih polifenola iznosi 491,718 mg EGK 100 g⁻¹. Obzirom da amplituda nema značajan statistički utjecaj, nije potrebno koristi maksimalnu vrijednost kako bi se postigli optimalni rezultati. Tom prilikom dolazi do uštede potrošene energije i očuvanja nastavka ultrazvučne sonde koji se prilikom tretmana troši. Nadalje, vrijeme kao faktor nema statistički utjecaj, no vidljiv je utjecaj vremena na udio ukupnih polifenola. Prilikom optimizacije treba uzeti u obzir tu činjenicu kako bi se izbjegli negativni utjecaji ultrazvuka na takve spojeve (npr. nastanak slobodnih radikala).

4.3 Utjecaj UAE na masenu koncentraciju ukupnih proteina

Tablica 9. Rezultati mjerenje masene koncentracije ukupnih proteina u uzorku SPK

Uzorak	Vrijeme [min]	Amplituda [%]	Ukupni proteini [mg L ⁻¹ uzorka]
U1	6	100	0,8705 ± 0,06
U2	6	75	0,7368 ± 0,14
U3	9	100	0,8715 ± 0,09
U4	9	50	0,7062 ± 0,12
U5	9	75	0,6213 ± 0,05
U6	3	75	0,6110 ± 0,10
U7	6	50	0,5126 ± 0,12
U8	3	100	1,1012 ± 0,08
U9	3	50	0,6617 ± 0,10

Iz rezultata prikazanih u tablici 9 uočavamo kako je najveća masene koncentracija proteina izmjeren u uzorku U8 (1,1012 ± 0,08 mg L⁻¹) koji je tretiran ultrazvukom 3 minute i amplitudom 100%. Zatim slijede uzorci U3 i U1 kod kojih je izmjerena slična vrijednost udjela proteina 0,8715 ± 0,09 mg L⁻¹ i 0,8705 ± 0,06 mg L⁻¹. Kod sva tri uzorka zajednička je amplituda (100 %) koja se pokazala najučinkovitija u ekstrakciji proteina, dok ista teza ne vrijedi za polifenole. Negativan trend se nastavlja. Najniža vrijednost masene koncentracije proteina izmjerena je u uzorku U7 (0,5126 ± 0,12 mg L⁻¹) tretiranog 6 minuta, amplitudom 50 %. Prilikom izvođenja eksperimenta pretpostavljalo se kako će uzorak U3 sadržavati najveći udio proteina, a uzorak U9 najniži udio proteina. Budući da se tijekom tretiranja uzorka U3 primjenjivala najviša vrijednost vremena (9 minuta) i amplitude (100 %), a najniža vrijednost vremena (3 minute) i amplitude (50 %) kod uzorka U9. Krajnji rezultati mjerenja govore drugačije. Mogući razlog je ljudski faktor tijekom izvođenja eksperimenta te nastajanje mikropodručja izrazito visoke temperature uzrokovane kavitacijom.

Zhang i sur. (2021) utvrdili su udio proteina od 10,16 % u uzorku srebrne pokožice kave nakon provedene UAE. Wen (2019) je u svom radu izmjerio nešto veće udjele proteina (14,62 %) u odnosu na već spomenuto istraživanje Zhang.

4.3.1 Statistička obrada rezultata i optimiranje parametara

Tablica 10. Statistički značajne varijable za masenu koncentraciju ukupnih proteina

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F- omjer	p-vrijednost
A:amplituda	0,154465	1	0,154465	13,02	0,0365
B:vrijeme	0,00509834	1	0,00509834	0,43	0,5589
AA	0,0342783	1	0,0342783	2,89	0,1877
AB	0,0187964	1	0,0187964	1,58	0,2972
BB	0,0061642	1	0,0061642	0,52	0,5231
Ukupna pogreška	0,0355909	3	0,0118636	-	-
Ukupna (ispravljeno)	0,254393	8	-	-	-

R-kvadrat = 86,0095 %

R-kvadrat (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 62,692 %

Standardna pogreška, procjena= 0,10892

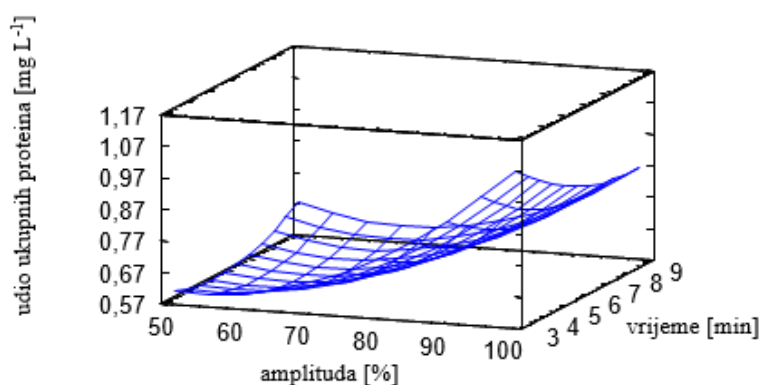
Srednja apsolutna greška = 0,0521975

Durbin-Watson statistika = 1,65259 (p=0,1959)

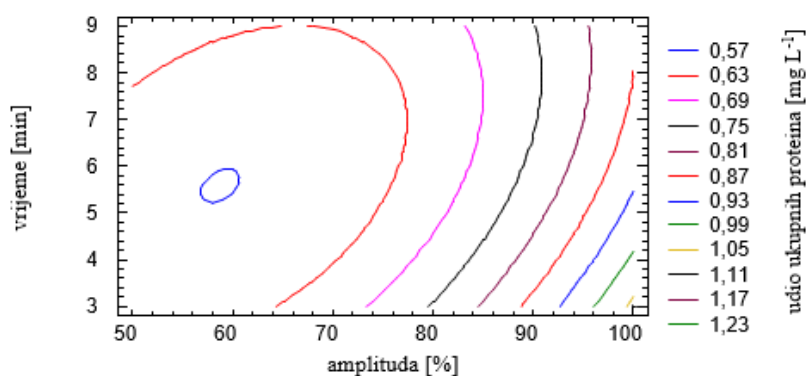
Lag 1 rezidual autokorelacija = 0,107298

*Crveno označene vrijednosti označavaju statistički značajne vrijednosti ($p \leq 0,05$)

Iz rezultata dobivenih analizom varijanci za udio ukupnih proteina (tablica 10) gdje se testira statistička značajnost svakog faktora usporedbom srednjeg kvadrata s procjenom eksperimentalne pogreške. Značajan statistički učinak na udio ukupnih proteina ($p < 0,05$) ima amplituda. P- vrijednost iznosi 0,0365 što ukazuje na to da se značajno razlikuje od nule na razini pouzdanosti od 95,0 %. Iz toga zaključujemo kako visina amplitude ima najveći učinak na prinos proteina tijekom UAE. Stoga, prilikom optimizacije parametara UAE treba pažljivo prilagoditi visinu amplitude kao bi se postigli optimalni rezultati ekstrakcije.



Slika 17. 3D dijagram odzivne površine za udio ukupnih proteina



Slika 18. Konturni dijagram odzivne površine za udio ukupnih proteina

Grafički prikaz 3D dijagrama (slika 17) i konturnog dijagrama (slika 18) predstavlja hipotetski model kojim će se mijenjati udio ukupnih proteina promjenom vrijednosti amplitude i vremena tretiranja. Model je kreiran nakon što smo spoznali kako najznačajniji učinak ima vrijednost amplitude tijekom ekstrakcije. Polukružne linije konturnog dijagrama pokazuju put najstrmijeg uspona odnosno spuštanja. Grafički prikaz predstavlja put od središta trenutne eksperimentalne regije duž kojega se procijenjeni odgovor najbrže mijenja za najmanju promjenu eksperimentalnih faktora. Uz pomoć njega možemo lakše manipulirati procesom ukoliko želimo povećati ili smanjiti udio proteina.

Tablica 11. Polinom i predviđena vrijednost udjela ukupnih proteina i rezultati optimizacije

	Polinom i predviđena vrijednost	Rezultat optimizacije																																							
Udio ukupnih proteina	$\text{Udio ukupnih proteina} = 1,18532 - 0,019518 \cdot A - 0,0151889 \cdot B + 0,000209467 \cdot A^2 - 0,000914 \cdot A \cdot B + 0,00616852 \cdot B^2$	Optimalna vrijednost $= 1,06394 \text{ mg L}^{-1}$																																							
	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2"></th> <th><i>Predviđeno</i></th> </tr> <tr> <th><i>amplituda</i></th> <th><i>vrijeme</i></th> <th><i>udio ukupnih proteina</i></th> </tr> <tr> <th>(%)</th> <th>(min)</th> <th>(mg L⁻¹)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>75,0</td> <td>6,0</td> <td>0,619356</td> </tr> <tr> <td>76,0</td> <td>5,97767</td> <td>0,626224</td> </tr> <tr> <td>77,0</td> <td>5,95429</td> <td>0,63357</td> </tr> <tr> <td>78,0</td> <td>5,92996</td> <td>0,641398</td> </tr> <tr> <td>79,0</td> <td>5,90478</td> <td>0,649708</td> </tr> <tr> <td>80,0</td> <td>5,87882</td> <td>0,658504</td> </tr> </tbody> </table>			<i>Predviđeno</i>	<i>amplituda</i>	<i>vrijeme</i>	<i>udio ukupnih proteina</i>	(%)	(min)	(mg L ⁻¹)	75,0	6,0	0,619356	76,0	5,97767	0,626224	77,0	5,95429	0,63357	78,0	5,92996	0,641398	79,0	5,90478	0,649708	80,0	5,87882	0,658504	<table border="1"> <thead> <tr> <th><i>Faktor</i></th> <th><i>Najniža</i></th> <th><i>Najviša</i></th> <th><i>Optimalna</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Amplituda (%)</td> <td>50,0</td> <td>100,0</td> <td>100,0</td> </tr> <tr> <td>Vrijeme (min)</td> <td>3,0</td> <td>9,0</td> <td>3,0</td> </tr> </tbody> </table>	<i>Faktor</i>	<i>Najniža</i>	<i>Najviša</i>	<i>Optimalna</i>	Amplituda (%)	50,0	100,0	100,0	Vrijeme (min)	3,0	9,0	3,0
			<i>Predviđeno</i>																																						
	<i>amplituda</i>	<i>vrijeme</i>	<i>udio ukupnih proteina</i>																																						
	(%)	(min)	(mg L ⁻¹)																																						
	75,0	6,0	0,619356																																						
	76,0	5,97767	0,626224																																						
	77,0	5,95429	0,63357																																						
	78,0	5,92996	0,641398																																						
79,0	5,90478	0,649708																																							
80,0	5,87882	0,658504																																							
<i>Faktor</i>	<i>Najniža</i>	<i>Najviša</i>	<i>Optimalna</i>																																						
Amplituda (%)	50,0	100,0	100,0																																						
Vrijeme (min)	3,0	9,0	3,0																																						

*A- amplituda, B- vrijeme

U tablici 11 prikazani su polinom i predviđene vrijednosti parametara UAE i optimalni parametri UAE. Pomoću polinoma mogu se izračunati očekivane masene koncentracije proteina promjenom nekog od parametara. Rezultati optimizacije provedene UAE iznose 3 minute za vremenski interval trajanja tretmana i amplitudu od 100 %. Stoga nije potrebno tretirati uzorke duže od 3 minute, jer vrijeme nema statistički značajan utjecaj na udio proteina. Važno je pravilno optimizirati tehnološki proces kako bi se smanjila nepotrebna potrošnja resursa, a pritom postigli najbolji rezultati

Tablica 12. Rezultati optimizacije UAE

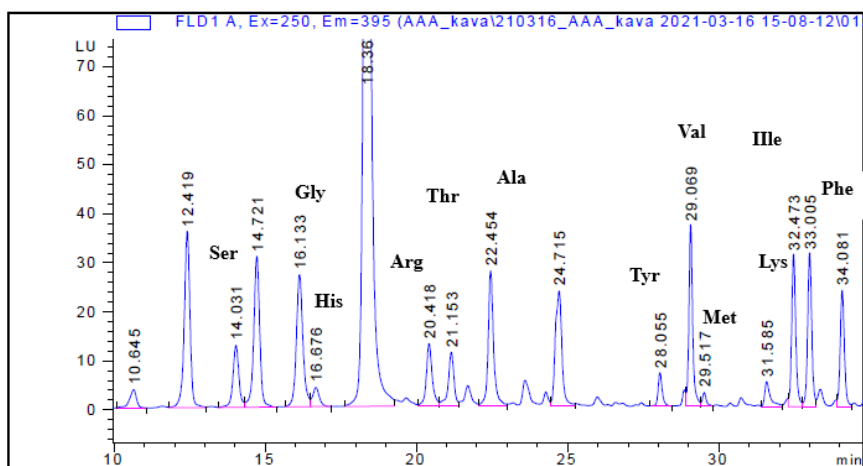
<i>Faktor</i>	<i>Najniža</i>	<i>Najviša</i>	<i>Optimum</i>	<i>Promatrane komponente</i>	<i>Optimalne vrijednosti</i>
amplituda	50,0	100,0	100,0	udio ukupnih proteina [mg L ⁻¹]	0,8685
vrijeme	3,0	9,0	9,0	udio polifenola [mg EGK 100 g ⁻¹]	485,317

Rezultati optimizacije UAE (tablica 12) pokazuju da se primjenom amplitude 100,00 % i vremenom od 9 minuta postižu optimalne vrijednosti udjela proteina (0,8685 mg L⁻¹) i polifenola (485,317 mg EGK 100 g⁻¹). No, u pojedinačnim analizama visina amplitude ima značajan utjecaj na udio proteina. Na udio polifenola vidljiv je utjecaj vremena, no nije

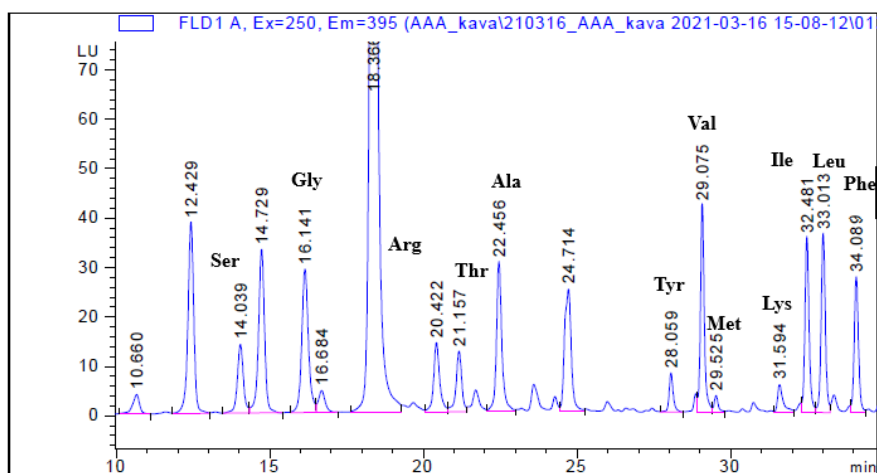
statistički značajan. Stoga to treba uzeti u obzir prilikom dizajniranja UAE kako bi se smanjilo nepotrebno trošenje energije i ostalih resursa.

4.4 Rezultati analize aminokiselina

Uzorci izoliranih proteina podvrgnuti analizi proteina i aminokiselina su odabrani na temelju optimalnih rezultata udjela ukupnih proteina. Statističkom analizom je utvrđen utjecaj amplitude na udio proteina, dok vrijeme značajno ne utječe. Stoga su odabrani uzorci U8 (100 % i 3 min) koji je pokazao najveću koncentraciju proteina te uzorak U6 (75 % i 3 min). Zanimao nas je utjecaj promjene amplitude na sastav proteina, neovisno o koncentraciji proteina i vremenskom intervalu.



Slika 19. HPLC kromatogram uzorka U6



Slika 20. HPLC kromatogram uzorka U8

Tablica 13. Izračunate koncentracije aminokiselina u uzorcima.

Aminokiselina*	RT	U6 [pmol μL^{-1}]	U8 [pmol μL^{-1}]
Asx^a	12,45	539,03	577,53
Ser	14,05	148,91	163,49
Glx^a	14,75	423,38	454,45
Gly	16,15	382,67	412,37
His	16,69	34,22	38,87
Arg	20,42	110,81	121,82
Thr	21,17	92,49	100,72
Ala	22,47	206,32	226,69
Pro	24,63	486,73	523,03
Tyr	28,06	41,72	46,99
Val	29,09	110,71	125,81
Met	29,54	12,08	14,12
Lys	31,61	44,60	48,98
Ile	32,50	82,36	94,52
Leu	33,03	85,17	98,27
Phe	34,11	52,33	60,83

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

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

Nakon provedene analize aminokiselina uzoraka U6 i U8, iz dobivenih HPLC- kromatograma (slika 19 i 20) su očitane koncentracije pojedinih aminokiselina i prikazane u tablici 13. Primjećujemo da je najveća koncentracija aminokiselina Asx u oba uzorka. Asx predstavlja kumulativ koncentracija aminokiselina Asn i Asp. Naime, tijekom provedbe kiseline hidrolize dolazi do konverzije Asp u Asn, zbog tog se ne može definirati točan udio pojedine aminokiseline. Nadalje, uzorci sadrže značajnu koncentraciju aminokiseline Pro. Ona u uzorku U6 iznosi 486,73 pmol μL^{-1} , dok u uzorku U8 iznosi 523,03 pmol μL^{-1} . Aminokiselina Glx je nešto manje koncentrirana u oba uzorka. Ona je također kumulativ koncentracije jer dolazi do

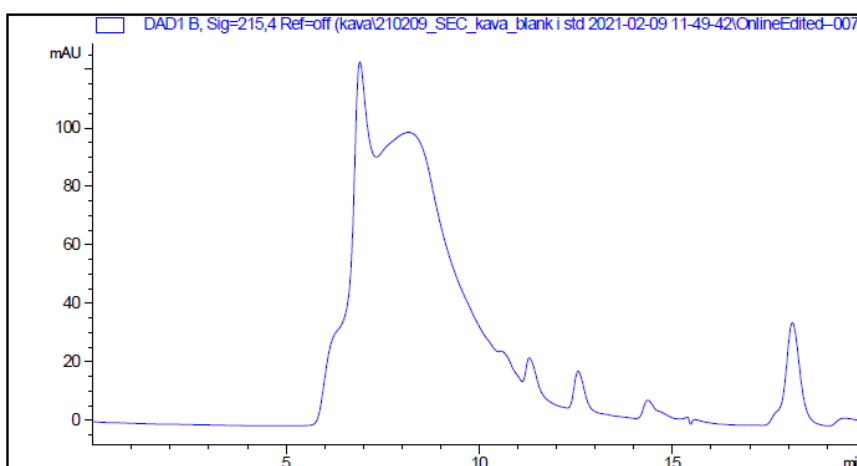
konverzije tijekom hidrolize, Glu u Gln. Aminokiseline Asp i Glu su poznate pod nazivom umami aminokiseline, zbog specifičnog utjecaja na okus tijekom konzumacije namirnice bogate ovim aminokiselinama. Prema zastupljenosti u nizu slijedi aminokiselina Gly, koja je ujedno građom najjednostavnija aminokiselina. Analizom je utvrđena prisutnost gotovo svih esencijalnih aminokiselina (Phe, His, Ile, Leu, Lys, Met, Tyr, Val). Nedostaje Thr, kojeg nije moguće izmjeriti ovom metodom jer dolazi do njegove degradacije. Upravo ta spoznaja predstavlja veliki potencijal primjene SPK u ljudskoj prehrani. Koncentracije aminokiselina u oba uzorka se minimalno razlikuju, ali koncentracije svih aminokiselina su nešto više u uzorku U8 (tablica 13). Razlog tome je što, uzorak U8 sadrži veći maseni udio ukupnih proteina ($1,1012 \pm 0,08 \text{ mg L}^{-1}$) u odnosu na uzorak U6 ($0,6110 \pm 0,10 \text{ mg L}^{-1}$) (tablica 9).

Slične rezultate su postigli Zhang i sur. (2021) u svom istraživanju. Uspoređivali su udjele fenolnih spojeva i aminokiselina u uzorcima srebrne pokožice kave, pivskog tropa i kore krumpira nakon provedene UAE. Također, su kao ekstrakcijskog otapalo upotrijebili deioniziranu vodu. Proveli su kiselinsku hidrolizu primjenom 6 M otopine klorovodične kiseline. Konstatirali su kako su najzastupljenije aminokiseline Asx i Glx ($9 \pm 0,2 \text{ mg g}^{-1}$). Dok aminokiselinu Pro nisu detektirali. Prema zastupljenosti slijede aminokiseline Gly ($6 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}$) i Ala ($5 \pm 0,2 \text{ mg g}^{-1}$). Nisu detektirali sve esencijalne aminokiseline. Dokazali su ukupnu količinu aminokiselina u vrijednosti od $85 \pm 4 \text{ mg g}^{-1}$. Uzorci kore krumpira pokazuju znatno niže vrijednosti aminokiselina, što se i vidi iz ukupne količine aminokiselina ($42 \pm 3 \text{ mg g}^{-1}$). Dok uzorci pivskog tropa sadrže znatno više udjele aminokiselina ($237 \pm 16 \text{ mg g}^{-1}$) u odnosu na ostale. Shodno tome, zaključili su kako pivski trop ima najveći potencijal kao sirovina za izolaciju određenih aminokiselina.

Wen (2019) je proučavao utjecaj UAE na udio aminokiselina u uzorku SPK. Valja napomenuti kako je on proveo uzastopnu alkalno-kiselinsku ekstrakciju, primijenio intenzitet ultrazvuka od 38 W cm^{-2} i vremenski interval od 10 minuta. Naposljetku je proveo alkalnu hidrolizu proteina. Shodno tome dobio je nešto drugačije rezultate. Koncentracija ukupnih aminokiselina iznosi $230,98 \pm 17,50 \text{ nmol mL}^{-1}$ (0.2 M NaOH) i $435,61 \pm 1,80 \text{ nmol mL}^{-1}$ (0.6 M NaOH). Najzastupljenija aminokiselina u oba slučaja je Gly, a tek onda slijede Asp i Glu. No, većinu esencijalnih aminokiselina nije detektirao, tek poneke.

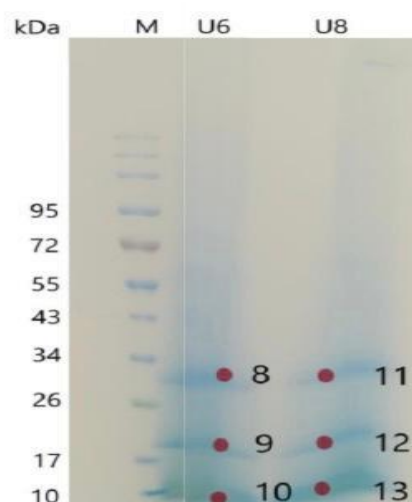
4.5 Rezultati SEC- HPLC analize

Rezultati HPLC-SEC analize prikazani su na slici 21. No, obzirom na nisku razlučivost, SEC-HPLC metoda nije korištena kao separacijska tehnika koja je prethodila identifikaciji spektrometrom masa. Stoga je provedena SDS- PAGE analiza proteina.



Slika 21. SEC-HPLC kromatogram uzorka U6 i U8

4.6 Rezultati SDS- PAGE analize



Slika 22. Gel dobiven nakon SDS-PAGE

Zbog niske razlučivosti SEC-HPLC metode, provedena je SDS-PAGE analiza proteina. Rezultati analize su vidljivi na slici 22. Sve proteinske linije označene na gelu su korištene za MS identifikaciju (tablica 14). Analiza je provedena na uzorcima U6 i U8. Promatrajući sliku

nakon provedene SDS-elektroforeze uočavamo kako oba uzorka sadrže proteine slične vrijednosti. Možemo zaključiti kako promjena parametra ekstrakcije značajno ne utječe na veličinu proteina. Na slici su jasno vidljive putanje proteina. Elektroforetska pokretljivost proteina ovisi o gustoći njihovog naboja, što je omjer gustoće naboja viši, pokretljivost je veća. Kada se otopina proteina podvrgne djelovanju električnog polja dolazi do gibanja molekula ovisno o gustoći svojeg naboja, kretat će se različitom brzinom prema anodi ili katodi i na taj način odjeliti. Svaki protein ima svoju karakterističnu izoelektričnu točku.

Tablica 14. Lista identificiranih proteina u uzorcima

Linija na gelu	Pristupni broj*	MW [kDa]	Vrednovanje pogodka**	Broj identificiranih peptida	Protein
1	A0A068TV85	48,9	416,1	7	Nekarakterističan
2	A0A068V707	70,2	827,4	12	Nekarakterističan
4	A0A068VGGK6	15,7	244,5	6	Sadrži Barwin domenu
5	A0A068V707	70,2	599,5	9	Nekarakterističan
7	A0A068VGGK6	15,7	144,2	4	Sadrži Barwin domenu
8	A0A068V707	70,2	322,6	6	Nekarakterističan
10	A0A068VGGK6	15,7	144,2	4	Sadrži Barwin domenu
11	A0A068V707	70,2	851,3	15	Nekarakterističan
13	A0A068VGGK6	15,7	144,2	4	Sadrži Barwin domenu

* Pristupni broj u UniProt bazi podataka

** Vrijednosti iznad 35 smatraju se statistički značajne ($p < 0.05$).

Nakon ekstrakcije i odjeljivanja proteina provedena je analiza peptida spektrometrom masa, dobiveni rezultati su identificirani pomoću baze podataka *UniProt* te prikazani u tablici 11. Pritom treba naglasiti kako su proteinske linije su izrezane na mjestima označenima na slici 19.

Najveća identificirana masa proteina iznosi 70,2 kDa. Dok najniža masa iznosi 15,7 kDa. Protein čija masa iznosi 15,7 kDa je karakteriziran kao protein koji sadrži Barwinovu domenu. Pretpostavka je da njegova struktura sadrži oko 125 aminokiselina i 3 disulfidna mosta zbog sadržaja aminokiseline Cys. Drugi pronađeni protein nema specifične karakteristike, osim velike mase. Wen (2019) je tijekom svog istraživanja analizirao masu izoliranih proteina i zabilježio nešto drugačije rezultate. No, primjenjivao je drugačije ekstrakcijske metode. Raspon masa proteina se kretao između 4,99 i 6,89 kDa. Proveo je SEC-HPLC analizu za određene proteine i detektirao znatno velik pik koji se odnosi na proteine velike molekulske mase (između 375 kDa i 520 kDa) i manje peptide u rasponu od 1,8 do 8,8 kDa. Stoga je zaključio kako primjena uzastopne kiselinske i alkalne ekstrakcije može utjecati na hidrolizu proteina u manje proteine ili kraće peptide.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata i provedene statističke analize može se zaključiti:

1. Uspješno je provedena UAE, tijekom koje su praćene promjene vrijednosti energije, snage i temperature. Izolirani su proteini i polifenoli iz uzorka srebrne pokožice kave.
2. Obradom rezultata dolazimo do spoznaje kako su najviši prinosi ukupnih polifenola ($525,6778 \pm 0,03$ mg EGK 100 g^{-1}) izoliranih iz srebrne pokožice kave primjenom UAE dobiveni primjenom amplitude 75 % i vremenskog intervala od 9 minuta. Dok je najviši prinos ukupnih proteina ($1,1012 \pm 0,08$ mg L^{-1}) postignut primjenom amplitude 100 % i vremenom tretiranja od 3 minute. Statističkom analizom parametara utvrđeno je kako amplituda ima statistički značajan utjecaj na masenu koncentraciju proteina ($p < 0,05$). No, na maseni udio polifenola niti jedan od parametara nema statistički značajan utjecaj.
3. Optimalni parametri UAE za udio ukupnih polifenola su amplituda od 88,09 % i vrijeme tretiranja od 9 minuta. Također, optimalni parametri UAE za udio ukupnih proteina su amplituda od 100 % i vrijeme tretiranja 3 minute. Optimalni parametri UAE kada se uzmu u obzir i udjeli ukupnih polifenola i proteina su amplituda 100 % i vrijeme 9 minuta.
4. Najzastupljenije aminokiseline u izoliranim proteinima su: Asp, Glu, Pro, Gly i Ala. Izolirani proteini sadrže gotovo sve esencijalne aminokiseline.
5. Analizom izoliranih proteina utvrđena je prosječna masa proteina od 15,7 kDa i 70,2 kDa. Protein prosječne mase 15,7 kDa sadrži Barwinovu domenu.
6. Srebrna pokožica kave predstavlja nutritivno bogatu sirovinu s velikim potencijalom, posebice u proizvodnji funkcionalne hrane, potičući održivi razvoj u prehrambenoj industriji.

6. LITERATURA

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials. *J. Food Eng.* **117**, 426-436. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.01

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chem.* **99**, 191-203. doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.042

Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P.(2004) Coffee tea, Cocoa. U: Food Chemistry. 3.izd., Springer, Heidelberg, str. 939-951.

Benitez, V., Rebollo-Hernanz, M., Hernanz, S., Chantres, S., Aguilera, Y., Martin-Cabrejas, M.A. (2019) Coffee parchment as a new dietary fiber ingredient: Functional and physiological characterization. *Food Res. Int.* **122**, 105–113. doi:10.1016/j.foodres.2019.04.002

Berg, J. M., Tymoczko, J. T., Stryer, L. (2002) Biochemistry, 5.izd., W. H. Freeman, New York.

Bessada, S. M., Alves, R.C., Oliveira, M.B.P.P. (2018) Coffee silverskin: A review on potential cosmetic applications. *Cosmetics.* **5**, 1-11. doi:10.3390/cosmetics5010005

Chala, B., Oechsner, H., Latif, S., Müller, J. (2018) Biogas Potential of Coffee Processing Waste in Ethiopia. *Sustainability.* **10**, 1-14. doi:10.3390/su10082678

Chemat, F., Khan, M. K. (2011) Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochem.* **18**, 813-835. doi:10.1016/j.ultsonch.2010.11.023

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M. (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. *Ultrasonics Sonochem.* **34**, 540-560. doi:10.1016/j.ultsonch.2016.06.035

Cho, Y.H., Bahuguna, A., Kim, H.H, Kim, D.I., Kim, H.J., Yu, J.M., Jung, H.G., Jang, J.Y., Kwak, J.H., Park, G.H. (2017) Potential effect of compounds isolated from *Coffea arabica* against UV-B induced skin damage by protecting fibroblast cells. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **174**, 323–332. doi:10.1016/j.jphotobiol.2017.08.015

Clarke, R.J., (2012) *Coffee: Volume 2: Technology*. Springer, London, str. 154-257. doi:10.1007/978-94-009-3417-7

Delonghi: Put od biljke do šalice (2021), <www.delonghi.com/hr-hr/proizvodi/kava/kultura-kave/proces-proizvodnje-kave>. Pristupljeno 2. kolovoza 2021.

Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**, 22-33.

EC (2019) Europski zeleni plan: zaključci. EC- Vijeće Europske unije, Bruxelles, <<https://www.consilium.europa.eu/hr/policies/green-deal/>>. Pristupljeno 8. kolovoza 2021.

Ercan, S.S., Soysal, C. (2013) Use of ultrasound in food preservation. *Nat. Sci.* **5**, 5-13. doi:10.4236/ns.2013.58A2002

Farah, A. (2012) Coffee Constituents. U: *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*. A John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, str. 21-58.

Gouvea, B.M.; Torres, C., Franca, A.S., Oliveira, L.S., Oliveira, E.S. (2009) Feasibility of ethanol production from coffee husks. *Biotechnol. Lett.* , **31**, 1315–1319. doi:10.1007/s10529-009-0023-4

Heeger, A., Kosińska-Cagnazzo, A., Cantergiani, E., Andlauer, W. (2016) Bioactives of coffee cherry pulp and its utilisation for production of Cascara beverage. *Food Chem.* **221**, 969–975. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.11.067

Hildebrand G, Poojary MM, O'Donnell C et al (2020) Ultrasoundassisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction. *J. Appl. Phycol.* **32**,1709–1718. doi:10.1007/s10811-020-02105-4

Ioannou, I., Ghoul, M. (2012) Biological activities and effects of food processing on flavonoids as phenolic antioxidants. U: *Advances in applied biotechnology*. (Petre, M., ured.), InTech., Rijeka, str. 101-124.

- Iriondo-DeHond, A., Iriondo-DeHond, M., Del Castillo, M. D. (2020) Applications of compounds from coffee processing by-products. *Biomolecules*. **10**, 1-20. doi:10.3390/biom10091219
- Iriondo-DeHond, A., Martorell, P., Genovés, S., Ramón, D., Stamatakis, K., Fresno, M., Molina, A., del Castillo, M.D. (2016) Coffee silverskin extract protects against accelerated aging caused by oxidative agents. *Molecules*. **21**, 1-14. doi:10.3390/molecules21060721
- Jambrak, A. R., Herceg, Z., Šubarić, D., Babić, J., Brnčić, M., Brnčić, S. R., Bosiljkov, T., Čveka, B., Tripalo, J., Gelo, J. (2010) Ultrasound effect on physical properties of corn starch. *Carbohydr. Polym.* **79**, 91-100. doi:10.1016/j.carbpol.2009.07.051
- Jaiswal, R., Kuhnert, N. (2010) Hierarchical scheme for liquid chromatography/multi-stage spectrometric identification of 3, 4, 5-triacyl chlorogenic acids in green Robusta coffee beans. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**, 2283-2294. doi:10.1002/rcm.4639
- Janissen, B., Huynh, T. (2018). Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. *Resour. Conserv. Recycl.* **128**, 110-117. doi:10.1016/j.resconrec.2017.10.001
- Jayasooriya, S. D., Bhandari, B. R., Torley, P., D'arcy, B. R. (2004) Effect of high power ultrasound waves on properties of meat. *Int. J. Food Prop.* **7**, 301-319. doi:10.1081/JFP-120030039
- Kardos, N., Luche, J. L. (2001) Sonochemistry of carbohydrate compounds. *Carbohydr. res.* **332**, 115-131. doi:10.1016/S0008-6215(01)00081-7
- Karlson, P. (1993) Biokemija za studente kemije i medicine, 7.izd. (preveli Mildner, P., Mildner,B.), Školska knjiga, Zagreb, str. 20-45.
- Klingel, T., Kremer, J. I., Gottstein, V., Rajcic de Rezende, T., Schwarz, S., Lachenmeier, D. W. (2020) A review of coffee by-products including leaf, flower, cherry, husk, silver skin, and spent grounds as novel foods within the European Union. *Foods*. **9**, 1-20. doi:10.3390/foods9050665

Leighton, T. G. (2007) What is ultrasound?. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **93**, 3-83. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.026

Lelas, V. (2006): Nove tehnike procesiranja hrane, *Mljekarstvo*. **56** , 311-330.

López-Barrera, D.M., Vázquez-Sánchez, K., Loarca-Piña, M.G.F., Campos-Vega, R. (2016) Spent coffee grounds, an innovative source of colonic fermentable compounds, inhibit inflammatory mediators in vitro. *Food Chem.* **212**, 282–290. doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.175

Martinez-Saez, N., Tamargo García, A., Domínguez Pérez, I., Rebollo-Hernanz, M., Mesías, M., Morales, F.J., Martín-Cabrejas, M.A., del Castillo, M.D. (2017) Use of spent coffee grounds as food ingredient in bakery products. *Food Chem.* **216**, 114–122. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.173

Marto, J., Gouveia, L.F., Chiari, B.G., Paiva, A., Isaac, V., Pinto, P., Simões, P., Almeida, A.J., Ribeiro, H.M. (2016) The green generation of sunscreens: Using coffee industrial sub-products. *Ind. Crop. Prod.* **80**, 93–100. doi:10.1016/j.indcrop.2015.11.03

Murthy, P.S., Naidu, M.M., Srinivas, P. (2009) Production of α -amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84**, 1246–1249. doi:10.1016/j.indcrop.2015.11.033

Narita, Y., Inouye, K. (2014) Review on utilization and composition of coffee silverskin. *Food Res. Int.* **61**, 16-22. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.023

Natucafé, S.A.S. CoffeeMucilage Concentrate (2021), <<http://natucafe.co/coffee-mucilage-concentrate> > Pristupljeno 11. kolovoza 2021.

Nelson, D. L., Cox, M. M. (2005) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4. izd., W.H. Freeman and Company, New York

Nzekoue, F.K., Angeloni, S., Navarini, L., Angeloni, C., Freschi, M., Hrelia, S., Vitali, L.A., Sagratini, G., Vittori, S., Caprioli, G. (2020) Coffee silverskin extracts: Quantification of 30 bioactive compounds by a new HPLC-MS/MS method and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Food Res. Int.* **133**, 109128. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109128

Odrz: Održivi razvoj. (2021), <<https://www.odraz.hr/nase-teme/odrzivi-razvoj/odrzivi-razvoj>>. Pristupljeno 2.kolovoza 2021.

Panusa, A., Petrucci, R., Lavecchia, R., Zuorro, A. (2017) UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS metabolic profiling and antioxidant capacity of arabica and robusta coffee silverskin: Antioxidants vs phytotoxins. *Food Res. Int.*, **99**, 155-165. doi:10.1016/j.foodres.2020.109128

Park, J., Kim, B., Lee, J.W., (2016) In-situ transesterification of wet spent coffee grounds for sustainable biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **221**, 55–60. doi:10.1016/j.biortech.2016.09.001

Pine, S. H. (1994) Organska kemija, 3. izd. (preveli Bregovec, I., Rapić, V.), Školska knjiga, Zagreb, str. 812-854.

Pourfarzad, A., Mahdavian-Mehr,H., Sedaghat,N. (2013) Coffee silverskin as a source of dietary fiber in bread-making: Optimization of chemical treatment using response surface methodology. *LWT Food Sci. Technol.* **50**, 599– 606. doi:10.1016/j.lwt.2012.08.001

Radojčić Redovniković, I. (2020) Osvježimo znanje: Zelena otapala. *KUI*, **69**, 670-671.

Rasines-Perea, Z., Teissedre, P. L. (2017) Grape polyphenols' effects in human cardiovascular diseases and diabetes. *Molecules*, **22**, 1-19. doi: 10.3390/molecules22010068

Rocha, M.V.P., de Matos, L.J.B.L., Lima, L.P.D., Figueiredo, P.M.D.S., Lucena, I.L., Fernandes, F.A.N., Gonçalves, L.R.B. (2014) Ultrasound-assisted production of biodiesel and ethanol from spent coffee grounds. *Bioresour. Technol.* **167**, 343–348. doi:10.1016/j.biortech.2014.06.032

Rodrigues, R.C, Nunes, M.A.A., Vinha, A.F., Oliveira, M.B.P.P. (2017) State of the art in coffee processing by-products. U: Handbook of Coffee Processing By-Products (Galanakis, C. M., ured.), Academic Press-Elsevier, London, str. 1–26. doi: 10.1016/B978-0-12-811290-8.00001-3

Sánchez-Rangel, J.C., Benavides, J., Heredia, J.B., Cisneros-Zevallos, L., Jacobo-Velázquez, D.A.(2013) The Folin–Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods* , **5**, 5990–5999. doi:10.1039/C3AY41125G

Shevchenko , A., Wilm, M., Vorm, O and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 850-858.

doi:10.1021/ac950914h

Shortle, E., O'Grady, M. N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**, 828-834.

doi:10.1016/j.meatsci.2014.07.001

Sonicator (2021) Q700 Sonicator - 700 watts with touch screen control Dostupno: <<https://www.sonicator.com/products/q700-sonicator>>. Pristupljeno 8. kolovoza 2021.

Šango, M. (2020). Karakterizacija funkcionalnih spojeva izoliranih iz espresso kave „Karoma “i srebrne pokožice kao njenog nusproizvoda (doktorski rad), Prehrambeno- biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Šimić, I. (2015). Ultrazvučna ekstrakcija pesticida iz uzorka čaja (diplomski rad), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Šimunac, D. (2004) Knjiga o kavi, Grafem, Zagreb.

Tiwari, B. K. (2015) Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends Analyt. Chem.*, **71**, 100-109. doi:10.1016/j.trac.2015.04.013

UN, Transforming Our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development (UN, New York, 2015); <<https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/transformingourworld>> Pristupljeno 8. kolovoza 2021.

Velez,R. A., Lopez, J. C. J. (2015) Process for Obtaining Honey and/or Flour of Coffee from the Pulp or Husk and the Mucilage of the Coffee Bean. U.S. Patent 9,635,877

Wen, L.(2019) Development of green extraction technologies for the extraction of biomolecules from coffee silverskin (doctoral thesis), School of Biosystems and Food Engineering, University College Dublin, Dublin

Wen, L., Zhange, Z., Rai, D., Sun, D.W., Tiwari, B. K. (2019) Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from coffee silverskin: Impact on phenolic content, antioxidant activity and morphological characteristics. *J. Food Process Eng.*, **42**, 13191 doi:10.1111/jfpe.13191

Woldesenbet, A.G., Woldeyes, B., Chandravanshi, B.S., (2016) Bio-ethanol production from wet coffee processing waste in Ethiopia. *SpringerPlus*. **5**, 1-7. doi:10.1186/s40064-016-3600-8

Zengin, G., Sinan, K. I., Mahomoodally, M. F., Angeloni, S., Mustafa, A. M., Vittori, S., Maggi, F., Caprioli, G. (2020) Chemical composition, antioxidant and enzyme inhibitory properties of different extracts obtained from spent coffee ground and coffee silverskin. *Foods*. **9**, 713. doi:10.3390/foods9060713

Zhang, Z., Poojary, M. M., Choudhary, A., Rai, D. K., Lund, M. N., Tiwari, B. K. (2021) Ultrasound processing of coffee silver skin, brewer's spent grain and potato peel wastes for phenolic compounds and amino acids: a comparative study. *J. Food Sci. Technol.* **58**, 2273–2282. doi:10.1007/s13197-020-04738-

IZJAVA O IZVORNOSTI

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.

Anamarija Grudenić
Ime i prezime studenta

STATEMENT OF ORIGINALITY

This is to certify, that the intellectual content of this thesis is the product of my own independent and original work and that all the sources used in preparing this thesis have been duly acknowledged.

Anamarija Grudenic

Name of student