

Netoplinske ekstrakcije RuBisCOa u svrhu proizvodnje bez otpada

Zorić, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:200804>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-12**



Repository / Repozitorij:

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



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

Marija Zorić
0058215381

**NETOPLINSKE EKSTRAKCIJE RUBISCO-A U
SVRHU PROIZVODNJE BEZ OTPADA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Fizikalna svojstva složenih sustava hrane

Mentor: Prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Zagreb, godina 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

Zavod za opće programe
Laboratorij za održivi razvoj

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Netoplinske ekstrakcije RuBisCO-a u svrhu proizvodnje bez otpada

Marija Zorić, 0058215381

Sažetak:

Nikada prije nisu bili postavljeni toliki zahtjevi prema prehrambenoj industriji kao danas. Osim što joj je zadatak proizvesti sigurnu, nutritivno bogatu hranu, fokus se sve više okreće prema održivoj proizvodnji. Ovaj rad povezuje ekstrakciju RuBisCO proteina iz listova šećerne repe, nusproizvoda iz prerađivačke industrije biljnog podrijetla, i netoplinskih tehnologija koje se u tu svrhu primjenjuju (ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija visoko naponskim električnim pražnjenjem i ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem). Zeleno lišće dugo se smatralo mogućim izvorom proteina za održivu proizvodnju hrane. Primjenom netoplinskih tehnika u ekstrakcijama, a ispunjavaju se ključni izazovi moderne prerade hrane – osiguranje isplative, održive i ekološki prihvatljive proizvodnje, te se i koncept Zero waste hrane čini ostvarivim.

Ključne riječi: RuBisCO, pulsirajuće električno polje (PEP), ultrazvuk (UV), visokonaponsko električno pražnjenje (HVED), Zero waste

Rad sadrži: 23 stranice, 6 slika, 1 tablicu, 43 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Datum obrane: 15.lipnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of general programs
Laboratory for sustainable development

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Non-thermal extractions of RuBisCO with purpose of waste-free production

Marija Zorić, 0058215381

Abstract:

Never before have so many demands been placed on the food industry as today. In addition to its task of producing safe, nutrient-rich food, the focus is more increased on sustainable production. This paper links the extraction of RuBisCO protein from sugar beet leaves, by-products from the processing industry of plant origin, and non-thermal technologies used for this purpose (ultrasonic extraction, high voltage electric discharge extraction and pulsed electric field assisted extraction). Green leaves have long been considered a possible source of protein for sustainable food production. By applying non-thermal techniques in extractions the key challenges of modern food processing are met - ensuring cost-effective, sustainable and environmentally friendly production, and the concept of Zero waste food seems feasible.

Keywords: RuBisCO, pulsed electric field, ultrasound, high voltage electrical discharge, Zero waste

Thesis contains: 23 pages, 6 figures, 1 tables, 43 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Anet Režek Jambrak, PhD Full Professor

Thesis defended: June 15, 2022

Sadržaj

1.UVOD	1
2.ŠEĆERNA REPA (<i>BETA VULGARIS</i>)	2
2.1. LIST ŠEĆERNE REPE.....	3
3.RUBISCO	4
4.NETOPLINSKE METODE EKSTRAKCIJE	7
4.1. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA PULSIRAJUĆIM ELEKTRIČNIM POLJEM	8
4.2. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM.....	10
4.3. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA VISOKONAPONSKIM ELEKTRIČNIM PRAŽNENJEM – PLAZMOM	12
5. ZERO WASTE.....	15
6. ODRŽIVOST	16
7. ZAKLJUČAK.....	18
8. POPIS LITERATURE	19

1. UVOD

Zamjena životinjskih proteina biljnim proteinima smatra se važnom strategijom za opskrbu esencijalnih hranjivih tvari sve većoj svjetskoj populaciji. U mnogim kulturama, životinjski proizvodi bili su primarni izvor proteina i drugih važnih hranjivih tvari. Međutim, masovna proizvodnja životinja zahtijeva ogromne količine područja za uzgoj stočne hrane vode, te stvara visoke emisije stakleničkih plinova (pogotovo metana) čime uz otpad, opterećuju okoliš. Stoga se tržište okreće biljkama kao izvor proteina te se upravo lišće biljaka smatra mogućim izvorom proteina za održivu proizvodnju hrane, zahvaljujući njihovom nutritivnom profilu i velikoj dostupnosti u poljoprivrednom otpadu. RuBisCO, kao najzastupljeniji protein na svijetu, vrlo je dobar kandidat. Gotovo svi industrijski procesi proizvodnje zahtijevaju neku vrstu ekstrakcije tijekom koje se koriste velike količine organskih otapala. Većina organskih otapala je zapaljiva, hlapljiva i često toksična te odgovorna za stvaranje efekta staklenika i onečišćenje okoliša. Zahvaljujući trendovima zelene analitičke kemije, tijekom posljednjih desetljeća učinjene su pozitivne promjene, poput smanjene uporabe otrovnih kemikalija i njihovog štetnog utjecaja na okoliš. Sukladno tome, razvoj inovativnih tehnika održive zelene ekstrakcije postao je zanimljiviji zbog čišće, zelenije i sigurnije prirode ovih procesa i lakšeg korištenja. Kao dobra zamjena konvencionalnim metodama javljaju se netoplinske metode ekstrakcije poput: ekstrakcije uz pomoć ultrazvuka, ekstrakcije visokonaponskim električnim pražnjenjem (hladna plazma) te ekstrakcije potpomognute pulsirajućim električnim poljem.

Cilj ovog rada je istražiti netoplinske tehnike ekstrakcije proteina RuBisCO u svrhu isplative, održive i ekološke proizvodnje bez otpada.

2. ŠEĆERNA REPA (*Beta vulgaris*)

Šećerna repa (*Beta vulgaris* var. *altissima*) je dvogodišnja biljka iz porodice *Chaenopodiaceae*, koja se uzgaja radi proizvodnje šećera, zbog visoke koncentracije saharoze u njezinom zadebljanom korijenu. Svoj životni ciklus prirodno završava za dvije godine. U prvoj godini stvaraju se listovi, a energija fotosinteze pohranjuje se kao saharoza u zadebljanom korijenu. U drugoj godini ta energija se iskorištava za proizvodnju cvatne stabljike, cvijeta, ploda i sjemena.

Jedna je od najbitnijih biljaka u prehrambenoj industriji s obzirom na čestu primjenu u prehrani čovjeka, njezina velika dostupnost opravdana je njezinom uzgoju na području umjerene klime Zemljine sjeverne polutke, što joj omogućava veliku rasprostranjenost u odnosu na šećernu trsku koja zahtjeva tropske uvjete.

Šećerna repa se uzgajala kao vrtno povrće prije više od 2000. godina te se naširoko koristila u razne kulinarske svrhe. Tek od 17. st., šećerna repa krenula se koristiti kao stočna hrana. Uzgoj šećerne repe (*Beta vulgaris*) za proizvodnju saharoze doživio je uspjeh u Sjedinjenim Američkim Državama oko 1870. godine te Sjedinjene Američke Države sada osiguravaju oko 11 % svjetske ponude šećerne repe, a šećerna repa osigurava oko 20 % svjetske potražnje za šećerom. Osim Sjedinjenih Američkih Država, Europska unija je također vodeća sila u proizvodnji šećera, a šećer od repe čini gotovo svu proizvodnju šećera u Europi (Berlowska i sur., 2018).

Šećerna repa sastoji se od oko 75 % vode, dok ostatak čini suha tvar koja se većinski sastoji od otopljenih šećera, celuloze, mineralnih soli, organskih spojeva s dušikom i ulja. Iz frakcije šećera se dobije oko 83 % od prisutnih šećera kao kristali saharoze, dok se 12.5 % izdvoji u obliku melase, koncentriranih nečistoća iz rafinacije šećera. Kako bi se korijen šećerne repe iskoristio u svakom pogledu, nusproizvodi industrije šećera - pulpa šećerne repe i melasa mogu se iskoristiti kao stočna hrana u suhom ili mokrom obliku.

2.1. List šećerne repe

Biljni listovi prepoznati su kao potencijalni izvor proteina za primjenu u hrani na temelju njihovog nutritivnog profila i velike dostupnosti u poljoprivrednom otpadu. Za većinu industrijaliziranih usjeva, samo određeni dijelovi biljaka (npr. korijen, cvijeće, plodovi) se beru i obrađuju, dok se listovi ostavljaju neiskorišteni. Ovo odbačeno lišće predstavlja mnogo tona biomase godišnje (Tenorio, 2017).

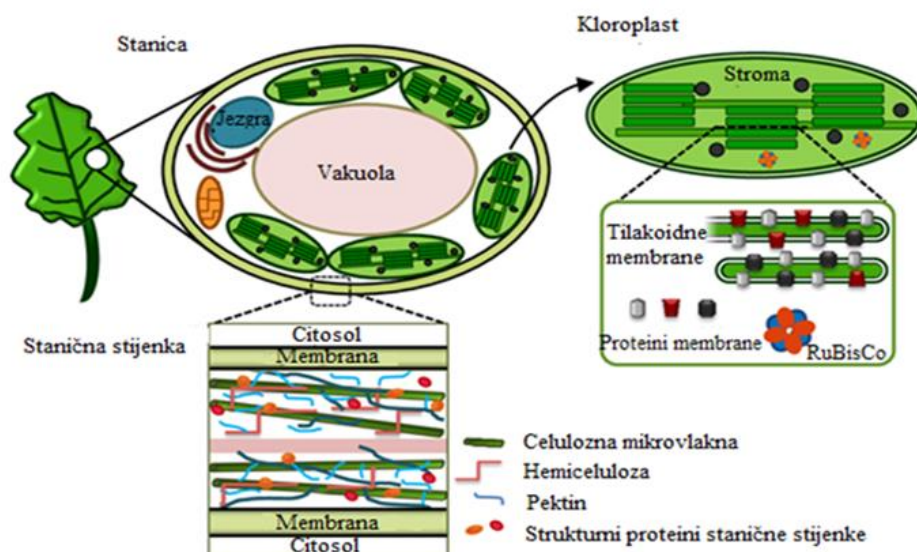
Vrhovi šećerne repe mogu se sastojati samo od listova šećerne repe ili od mješavine listova i krošnje. Vrhovi su otprilike jednaki težini korijena, ovisno o sorti, vremenu berbe i sezoni rasta. Listovi šećerne repe inače sadrže 12–14 % suhe tvari, bogati su proteinima, vitaminom A i ugljikohidratima stoga mogu osigurati jeftinu stočnu hranu za široku paletu farmske stoke. Osim proteina, listovi imaju bogat nutritivni profil (npr. dijetalna vlakna, minerali i sekundarni metaboliti) i sastoje se od složenih bioloških struktura (npr. kloroplastične membrane) koje mogu biti istražene kao nove frakcije koje u konačnici proširuju upotrebu lišća. U Nizozemskoj su provedene studije o mogućnosti korištenja biljnog otpada kao potencijalna zamjena za ekološki neodržive proteine, poput mesa, mliječnih proizvoda i soje, te su pokazale da veganski biljni protein bez glutena ekstrahiran iz prešanog zelenog soka od listova šećerne repe bio svestran poput kokošnjeg jajeta (Berlowska i sur., 2018).

Što se tiče vrste proteina, proteini lista se sastoje od topljivih i netopivih proteini. U topljivoj frakciji, enzim ribuloza bisfosfat karboksilaza oksigenaza (RuBisCO) čini gotovo polovicu topivih proteina. Netopljivi proteini uglavnom se sastoje od membranskih proteina u kloroplastičnim membranama (tj. tilakoidnim membranama), gdje su povezani s klorofilom, karotenoidima i lipidima. U biljnim stanicama većina topivih i netopivih proteina nalazi se u kloroplastima, gdje ti proteini pretvaraju svjetlosnu energiju u kemijsku energiju putem fotosintetskih reakcija. Netopljivi membranski proteini proizvode energiju kroz lanac prijenosa elektrona, a ta energija potiče fiksaciju CO_2 koju katalizira RuBisCO (MacAdam, 2009).

Listovi imaju više za ponuditi od proteina, bogati su mineralima, vitaminima, fitokemijskim tvarima i sekundarnim metabolitima. Neki od ovih spojeva su prepoznati kao nutraceutici s blagotvornim učinkom na zdravlje ljudi (Gaweł, 2012). Osim toga, listovi sadrže obilje ugljikohidrata ili vlakana koja tvore stanicu stijenke (slika 1) i daju krutost lisnom tkivu. Stanična

stijenka se sastoji od celulozne mikrofibrile postavljene u matricu neceluloznih polisaharida, strukturnih proteina i fenolnih komponenata (npr. lignin) (Beck, 2005). List je zapravo obilniji s ugljikohidratima nego s proteinima te se ugljikohidrati općenito odbacuju nakon početne obrade listova. Uobičajena upotreba odbačenih ugljikohidrata je za životinjsku stočnu hranu i biogorivo.

Do sada su proučavani samo topljivi proteini za primjenu u hrani zbog njihove bijele boje, nutritivne kvalitete i lakog ekstrahiranja (Bals i sur., 2012; T. Hernández i sur., 1997). Unutar topljivih proteina, RuBisCO protein je glavni za ekstrakciju s obzirom na njegovo obilje i specifičnu molekularnu težinu, što omogućuje korištenje kromatografskih tehnika za pročišćavanje te nastanak RuBisCO proteinskog izolata.



Slika 1. Shema biljne stanice i struktura stanične stijenke i kloroplasta (Tenorio, 2017)

3. RuBisCO

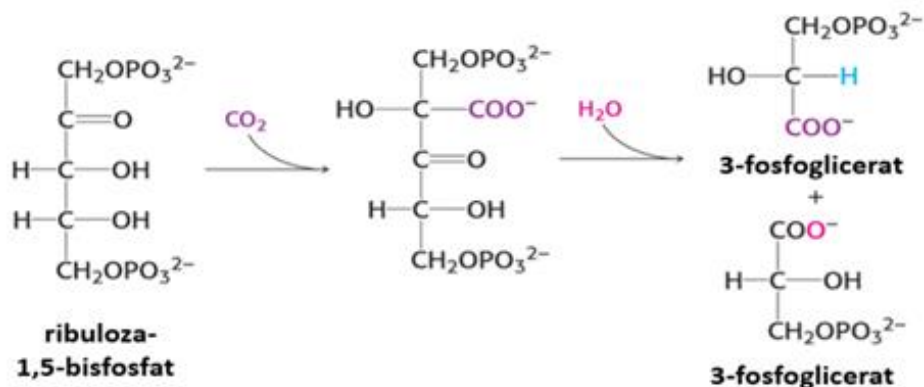
Ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza oksigenaza, najčešće poznat pod kraćim imenom RuBisCO, enzim je koji katalizira prvi veliki korak fiksacije ugljika, procesa kojim se atmosferski ugljični dioksid i voda pretvaraju u molekule bogate energijom kao što su glukoza, korištenjem sunčeve svjetlosti. U zelenim dijelovima biljaka protein RuBisCO može činiti do 50 % ukupne količine proteinske frakcije. Stoga je RuBisCO ključni fotosintetski enzim u

zelenom lišću biljaka i smatra se najzastupljenijim proteinom prisutnim na zemlji.

Zbog svoje ključne uloge u fotosintetskoj fiksaciji ugljika, RuBisCO se nalazi u većini autotrofnih organizama, uključujući kopnene i morske biljke, eukariotske alge, cijanobakterije i fotosintetske bakterije.

RuBisCO je nastao prije 3 milijarde godina u okruženju s visokim sadržajem CO₂ i niskim sadržajem kisika i postupno se prilagođavao promjenjivim atmosferskim uvjetima, razvijajući se do današnjeg oblika te nosi složene reakcijske mehanizme koji su nastali pod različitim uvjetima (Parry i sur., 2003, Whitney i sur., 2011).

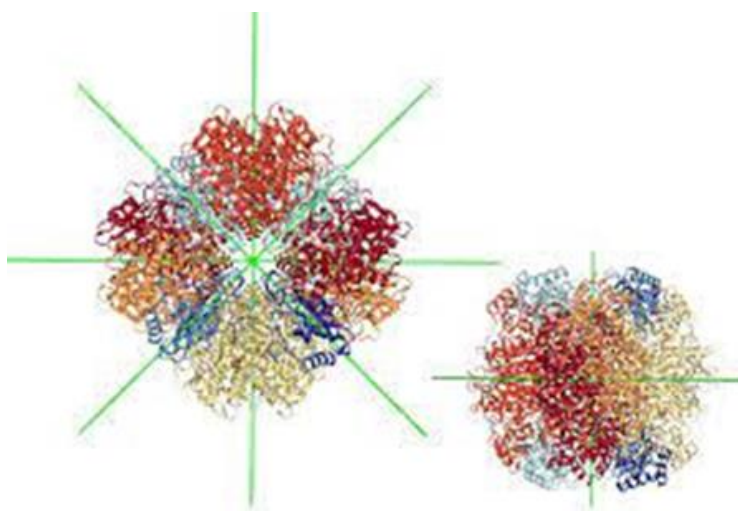
RuBisCO je glavni enzim koji katalizira prvi korak fiksacije ugljičnog dioksida u fotosintezi i oksidaciji ugljika tijekom fotorespiracije. Njegova primarna uloga je pretvorba ugljičnog dioksida iz biosfere u organske spojeve u koraku koji ograničava brzinu Calvinovog ciklusa (Spreitzer i Salvucci, 2002). To se postiže karboksilacijom ribuloza-1,5-bisfosfata (slika 2) za proizvodnju dvije molekule 3-fosfoglicerata (Andersson i Backlund, 2008).



Slika 2. Mehanizam karboksilacije ribuloza-1,5-bisfosfata (Berg i sur., 2013)

Afinitet RuBisCO-a za ugljični dioksid pogoduje njegovoj katalitičkoj aktivnosti fiksacije ugljika. Međutim, to je spriječeno njegovim afinitetom za molekularni kisik što rezultira fotorespiracijom. Ovaj proces usporava katalitičku aktivnost fiksacije ugljičnog dioksida i smanjuje aktivnost za 50 %, stoga se RuBisCO često naziva neučinkovitim enzimom (Andersson i Backlund, 2008, Spreitzer i Salvucci, 2002). Posljedično, fotosintetski organizmi proizvode RuBisCO u velikim količinama kako bi zadovoljili svoje metaboličke potrebe.

Postoje četiri organizacijska oblika RuBisCO-a: I, II, III, i IV (Andersson i Taylor, 2003; Tabita i sur., 2007). RuBisCO oblika I prevladava u višim biljkama, algama i cijanobakterijama. Enzim ima molarnu masu oko 560 kDa, a sastoji se od osam velikih (L) podjedinica molekulske mase od oko 56 kDa i osam malih (S) podjedinica molekulske mase oko 14 kD. Podjedinice se nalaze u heksadekamernoj strukturi, tvoreći bačvu od četiri velike podjedinice dimera koje su raspoređene oko četiri osi simetrije, zatvorene na svakom kraju s četiri male podjedinice (slika 3). Niz nukleotida koji kodira za velike podjedinice nalazi se u genima kloroplasta, dok su sekvence za male podjedinice kodirane genima jezgre (Malkin i Niyogi, 2000). Velike podjedinice imaju ulogu provođenju reakcije, dok male imaju ulogu u njihovoj regulaciji (Andersson, 2008).



Slika 3. RuBisCO iz špinata (Andersson, 1996)

Gusto zbijeni RuBisCO nalazi se unutar mobilne faze strome kloroplasta u koncentracijama od približno 300 mg/mL. Međutim, dobivena koncentracija RuBisCO od zelenog lišća ovisi o mnogim čimbenicima, kao što je starost biljke, vrijeme berbe, vrsta, uvjeti uzgoja (kao što je intenzitet svjetlosti i dostupnost dušika) i naravno učinkovitost metode koja se koristi za ekstrahirajte proteina.

Osim svoje obilne prisutnosti diljem svijeta, RuBisCO je od potencijalnog interesa za ljudsku prehranu zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti. RuBisCO sadrži velike količine esencijalnih aminokiselina, što ga čini prilično jedinstvenim među biljnim proteinima. Aminokiselinski profil RuBisCO-a ovisi od vrste do vrste, ali u prosjeku najzastupljenije aminokiseline su glicin, alanin, leucin te čine gotovo trećinu svih aminokiselina, dok su najmanje prisutni

triptofan, cistein i metionin, od kojih svaki pojedinačno čini oko 2 % prisutnih aminokiselina. Amino kiselinski sastav RuBisCO-a uspoređen je s razinom koju je preporučio Referentni obrazac FAO/WHO za prehranu ljudi te je RuBisCO pokazao kemijski rezultat 98 (Tablica 1.) (Fred van de Velde, 2011).

Tablica 1. Usporedba sastava esencijalnih aminokiselina RuBisCO-a i drugih bjelančevine hrane s referentnim uzorkom FAO/WHO za ljudsku ishranu (Fred van de Velde, 2011)

Amino kiselina	FAO/WHO	Cijelo jaje	Kazein	Sojina sačma	RuBisCO	Kemijski rezultat
lizin	5.5	6.4	8.0	6.9	6.5	>100
triptofan	1.0	1.2	1.3	1.3	2.7	>100
treonin	4.0	5.0	4.3	4.3	5.3	>100
1/2 cistein i metionin	3.5	5.5	3.5	2.4	3.4	98
valin	5.0	7.4	7.4	5.4	6.7	>100
izoleucin	4.0	6.6	6.6	5.1	4.9	>100
leucin	7.0	8.8	10.0	7.7	9.4	>100
tirozin i fenilalanin	6.0	10.1	11.2	8.9	12.8	>100

4. Netoplinske metode ekstrakcije

U prehrambenoj industriji razvojem tehnologije dolazi do razvoja novih tehnika procesiranja čiji je cilj unaprijediti već postojeće tehnike, ali i omogućiti nove načine obrade pojedinih namirnica koji su ekološki i ekonomski prihvatljiviji od postojećih načina obrade. Uz razvoj tehnologije kao jednog od pokretača, navodi se i drugi pokretač razvoja novih tehnika procesiranja

hrane, a to je svijest potrošača koja sve više zahtjeva minimalno procesiranu i visoko nutritivno vrijednu hranu. Kao odgovor na ovakve zahtjeve potrošača javljaju se netoplinke metode obrade kao što su ultrazvuk, pulsirajuće električno polja i primjena plazme. Netoplinke metode, kao što im i sam naziv govori, temelje se na primjeni temperatura koje su znatno niže od temperatura kod klasičnih metoda obrade pa time omogućuju očuvanje prirodno prisutnih nutritivno vrijednih sastojaka pojedine namirnice. Nove netoplinke metode ekstrakcije, osim što uklanjaju negativan utjecaj visoke temperature na degradaciju sastojaka, također nastoje poboljšati energetske efikasnost postupka smanjenjem vremena ekstrakcije, volumena utrošenog otapala i nastanka otpadnih materijala tijekom ekstrakcije koje je potrebno propisno zbrinuti.

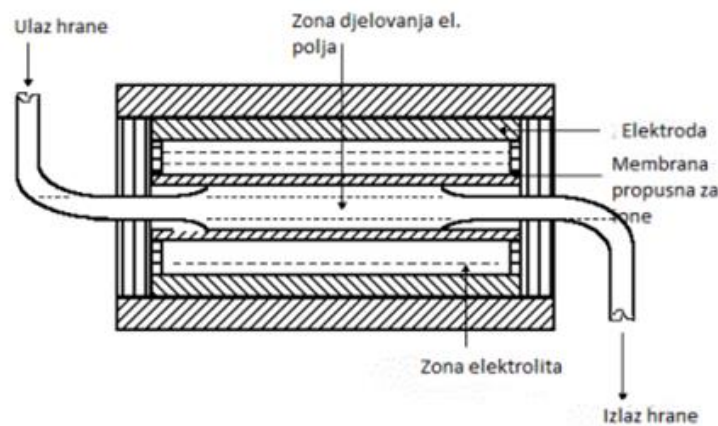
4.1. Ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem

Proces pulsirajućeg električnog polja (PEP, eng. *pulsed electric field*) brz je, netoplinski i vrlo učinkovit način za ekstrakciju unutarstaničnih spojeva te danas nalazi sve veću primjenu u prehrambenoj industriji. Izvedivost PEP-a kao tehnike ekstrakcije oslanja se na elektroporaciji, tj. oštećenju stanične membrane, koja omogućuje otapalima da prodru u stanice i otapaju spojeve od interesa (prema njihovim polaritetu) (Saldaña i sur., 2017; Yan i sur., 2017).

Fenomen elektroporacije nastaje kada su stanice izložene električnom polju i posljedično tome dolazi do nakupljanja naboja na staničnim membranama, potom dolazi do povećanja transmembranskog potencijala te stvaranje pora. Permeabilnost stanične membrane može se drastično povećati i to rezultira razgradnjom stanica. Opseg elektroporacije ovisi o nekoliko parametara, kao što su vrijeme tretmana, vrsta valnog oblika pulsa, broju impulsa, komponentama biljnog materijala i intenzitetu električnog polja (Alexandre i sur., 2019). Primjenu pulsirajućeg električnog polja moguće je provesti na različite načine i to eksponencijalno padajućim ili pravokutnim valovima, bipolarnim ili oscilirajućim pulsevima. Oblici valova imaju različit letalni utjecaj na mikroorganizme. Primarno mjesto djelovanja takvih pulseva je omotač stanice odnosno stanična membrana i stanična stijenka kod organizama koji posjeduju istu. Pulsevi visokog napona imaju mogućnost destabilizacije lipidno – proteinskog sloja stanične stijenke. Takav destabilizirani sloj postaje propustan za molekule koje inače ne propušta što uzrokuje bubrenje i krajnje pucanje stanične stijenke.

Uređaj za PEP sastoji se od: spremnika energije/ kondenzatora u kojem se energija skladišti, a potom prazni u obliku pulsa unutar komore, visokonaponskog generatora koji je izvor visokog

napona od 30 kV, te maksimalne snage od 120 W i maksimalnog iznosa struje od 10 mA, visokonaponske sklopke koja osigurava pražnjenje spremnika u određenom intervalu, komore za tretiranje s paralelnim pločama od nehrđajućeg čelika s razmakom od 1 cm, upravljačkog sklopa za automatsko upravljanje te upravljač pomoću kojega možemo upravljati uređajem sa sigurne udaljenosti, a sastoji se od tipki za pokretanje i zaustavljanje te tipki za podešavanje jakosti, trajanja i broja pulseva.



Slika 4. Shematski prikaz uređaja za tretiranje pulsirajućim el. poljem (Butler, 2012)

Prednosti PEP-a su: uništavanje vegetativnih bakterija, plijesni i kvasaca, kratko vrijeme obrade (< 1 s), očuvanje organoleptičkih svojstva i nutrijenata, dobra energetska učinkovitost – PEP tehnologiju karakterizira mala potrošnja i dobra iskoristivost energije. Naime postoje i nedostaci metode poput: slabog djelovanja na enzime i spore m.o., utjecaj produkata elektrolize na kvalitetu namirnice, mogu se obrađivati samo tekuće i polutekuće namirnice, te je manji učinak djelovanja na materijale sa većom električnom vodljivošću (Jelinić, 2020).

Literatura o upotrebi PEP-a za pomoć pri ekstrakciji proteina iz povrća je oskudna. Međutim, postoji mnogo radova koji istražuju ekstrakciju drugih bioaktivnih spojeva npr. polifenola. Jedno istraživanje pokazalo je njegovu primjenjivost za pomoć pri ekstrakciji proteina iz biomase sjemena uljane repice (stabljike i listova), te je utvrđeno da je samo uz visoku jakost električnog polja (20 kV/cm) došlo do povećanog prinosa proteina (oko 80 %) iz listova uljane repice (Yu, Bals, Grimi, i Vorobjev, 2015). Istraživanja o upotrebi PEF-a za ekstrakciju proteina dostupna su za alge (npr. *Nanochloropsis*, *Chlorella*) (Coustets & Teissié, 2016), te koštice masline (Roselló-Soto i sur., 2015).

4.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija jedna je od modernih tehnika ekstrakcije biljnih spojeva. Ultrazvuk (UZ) je definiran kao zvučni valovi koji imaju frekvenciju koja prelazi granicu ljudskog sluha (>20 kHz). Neke životinje koriste ultrazvuk za navigaciju (dupini) ili lov (šišmiši), te se ta informacija koju prenose zvučni valovi raspršuje unatrag. Ultrazvuk je jedna od tehnologija u nastajanju koja je razvijena za minimiziranje prerade, maksimiziranje kvalitete i osiguravanje sigurnosti prehrambenih proizvoda. Ultrazvuk se primjenjuje za postizanje pozitivnih učinaka u preradi hrane kao što je poboljšanje prijenosa mase, očuvanje hrane, pomoć kod toplinske obrade, manipulacija teksturom i analiza hrane (Knorr i sur., 2011).

Postoje brojni parametri ultrazvučnog vala kojim se može opisati, a bitno je istaknuti frekvenciju (f), koja predstavlja recipročnu vrijednost perioda titranja (T), intervala nakon kojeg se valno gibanje ponavlja. Mjerna jedinica je herc (Hz).

$$f=1T \text{ [1s=Hz]} \quad /1/$$

Uz frekvenciju, val se opisuje i valnom duljinom (λ), udaljenošću dvije susjedne točke koje su u fazi, odnosno dva udaljenošću dva susjeda brijega ili dola. Ono što povezuje ove dvije vrijednosti jest brzina širenja vala (v), čija je vrijednost umnožak valne duljine i frekvencije.

$$v=\lambda*f \quad /2/$$

Pojam s kojim se povezuje sa snagom ultrazvuka jest njegovi intenzitet (I), koji se definira kao snaga izvora zvuka podijeljena s jedinicom površine (A). Ako se promatra širenje ultrazvučnog vala konstantne snage iz određene točke u svim smjerovima, intenzitet će opadati kako se udaljenost od izvora povećava s obzirom na obrnutu proporcionalnost intenziteta i površine, koja je direktno proporcionalna s radijusom do kojeg vala doseže (O'Brien, 2007).

$$I=PS \text{ [Wm}^2\text{]} \quad /3/$$

Na temelju frekvencijskog raspona, primjenu ultrazvuka u obradi hrane, analizi i kontroli kvalitete možemo podijeliti na ultrazvuk niske i visoke energije. Ultrazvuk niske energije (male snage, niskog intenziteta) koristi frekvencije veće od 100 kHz pri intenzitetima ispod 1 W/cm², koji se može koristiti za neinvazivnu analizu i praćenje raznih prehrambenih materijala tijekom obrade i skladištenja kako bi se osigurala visoka kvaliteta i sigurnost. Ultrazvuk visoke energije

(velike snage, visokog intenziteta) koristi intenzitete veće od 1 W/cm^2 na frekvencijama između 20 i 500 kHz, koji su ometajući te izazivaju učinke na fizikalnim, mehaničkim ili kemijskim/biokemijskim svojstvima hrane. Ovi učinci obećavajući su u preradi, konzerviranju i sigurnosti hrane (Awad i sur., 2012).

Potreba za zamjenom opasnih organskih otapala za ekstrakciju dovela je do potrage za novim tehnikama ekstrakcije koje smanjuju volumen otapala koji se koristi, kako bi se zadovoljili i zahtjevi potrošača za prehrambenim proizvodima bez kemikalija, također kako bi se poboljšala ekološka održivost procesa i upravljanje s otpadom. Uspjeh ultrazvuka kao tehnike ekstrakcije ovisi o četiri bitna mehanizma, koji su prema Tiwari-ju (2015):

1. poboljšani prijenos mase akustičnim strujanjem i turbulentnim miješanjem
2. oštećenja na sučeljima otapalo-uzorak (površina uzorak u kontaktu s otapalom) uzrokovane udarnim valovima i mikrostrujanjima
3. sudari međučestica pri velikim brzinama
4. dezintegracija uzorka kako bi se maksimalno povećala površina kontakta

Ultrazvuk, kada je u kontaktu s uzorkom, proizvodi zvučne valove, koji su tada u stanju generirati fenomen zvan kavitacija, koji je karakteriziran stvaranjem, rastom i kolapsom mjehurića unutar stanice (Adetunji i sur., 2017). Mjehurići rasta povezani su s ciklusima širenja/kompresije koji utječu na staničnu strukturu povlačeći/gurajući molekularni sadržaj odvojeno/zajedno. Posljedično nastanak mjehurića unutar stanične stijenke dovodi do oštećenja njezine strukture, čime se olakšava prijenos mase iz stanične čestice u otapalo (Ebringerova i Hromadkova, 2010). U završnim fazama ekstrakcije, spojevi difundiraju iz stanice u otapalo. Čimbenici koji najviše utječu na ekstrakciju uz pomoć ultrazvuka povezani su matriksom uzorka, zbog svojstava kao što su tvrdoća, struktura, sastav, sadržaj vlage i veličina čestica. Također frekvencija, snaga, tlak, temperatura, vrijeme trajanja procesa i odabrano otapalo mogu značajno promijeniti konačni rezultat prinosa ekstrakcije jer svi ovi čimbenici mogu uvelike utjecati na intenzitet ultrazvuka prigušenjem zvučnih valova (Alexandre i sur., 2017).

U prehrambenoj industriji, ultrazvučna kavitacija se može koristiti samo za tekuće namirnice, radilo se o homogenim tekućinama, homogenim sustavima čvrsto-tekuće ili o sustavima tekuće-tekuće. Kombinacija UZ s drugim metodama daje još bolji učinak. Nekoliko studija sugeriralo je korištenje ultrazvuka u kombinaciji sa zelenim otapalima kao što su voda, etanol i suncokretovo ulje za poboljšanje ekstrakcije antioksidativnih spojeva (uglavnom fenolnih

spojeva), antocijana, karotenoida i polisaharida, uz smanjenje upotrebe organskih otapala (Alexandre i sur., 2017). Upotrebom blago nepolarnih otapala, kao što su etanol i aceton, može se omogućiti dobivanje većeg prinosa ekstrakcije lipidnih frakcija iz biomase, te se to pokušava koristiti kao zamjena tradicionalnim otapalima, poput n-heksana, koja se koriste za ekstrakciju lipida.

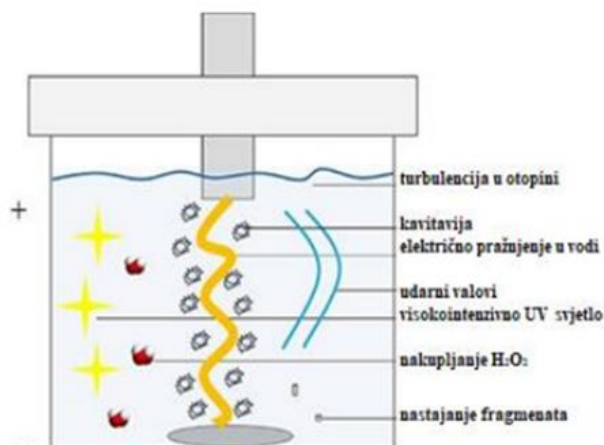
Ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka korištena je za ekstrakciju vrijednih proteina iz nekoliko nusproizvoda prehrambene industrije. Zhu i sur. (2009) pokazali su izvedivost ultrazvučnog predtretmana za povećanje ekstrakcije proteina iz odmašćenih pšeničnih klica reverznim micelama s konačnom učinkovitošću ekstrakcije proteina od 45,6 %. Preece, Hooshyar, Krijgsman, Fryer i Zuidam (2017) pokazali su da se ultrazvučnim tretmanom povećao prinos ekstrakcije proteina iz sojine kaše za 10 % nakon 1 minute tretmana, što se pripisuje poboljšanoj topljivosti, a ne poremećaju stanica. Nedavna istraživanja pokazala su da netoplinski tretmani, kao što je to ultrazvuk, imaju potencijal promijeniti alergijski učinak nekoliko namirnica. Li i sur. (2016) uspjeli su smanjiti alergijski učinak sojinih proteina za 18,9 % korištenjem ultrazvuka visokog intenziteta. Međutim, moraju se uočiti nedostaci UZ-a koji se očitavaju na mogućim promjenama u strukturi proteina, denaturaciji proteina i funkcionalnim svojstvima (smanjenje sposobnosti emulgiranja i pjenjenja), osobito u slučaju velike snage i produljenog vremena ultrazvuka. Yang i sur. (2017) su pokazali da ultrazvučnom predobradom nije došlo do značajnog povećanja stupanja hidrolize odmašćenog proteina pšeničnih klica. Nakon ultrazvučne obrade zabilježene su promjene u strukturi proteina, što je i dokazalo da ultrazvučnim tretmanom dolazi do promjene strukture proteina.

4.3. Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem – plazmom

Tretiranje visokonaponskim električnim pražnjenjem, hladnom plazmom, (HVED) jedna je od novih netoplinskih metoda koja se do sada u prehrambenoj industriji uglavnom koristila za sterilizaciju, inaktivaciju enzima i dezinfekciju vode. U posljednje vrijeme znanstvena istraživanja usmjerena su na primjenu visokonaponskog električnog pražnjenja za ekstrakcije bioaktivnih komponenata iz različitih sirovina. Sama metoda temelji se na električnom izboju između dvije elektrode uslijed djelovanja visokog napona i nastajanju hladne plazme. Kada se stanice nađu u električnom polju, otvaraju se pore staničnih membrana, tzv. fenomen elektroporacije, pri čemu dolazi do oslobađanja biomolekula iz stanica.

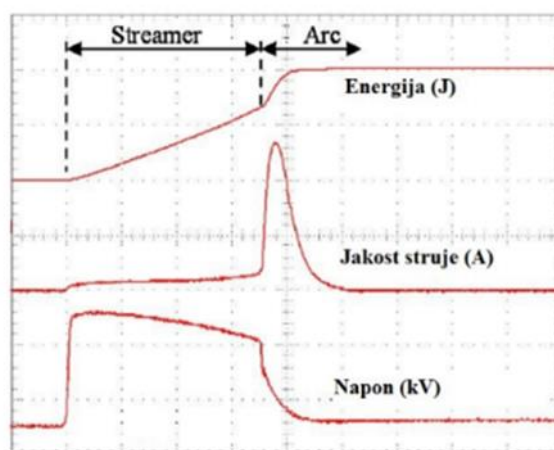
U električnim pražnjenjima karakterističnima za plazmu koja se generira u laboratorijskim uvjetima koristi se termin - hladna plazma. Plazma se definira kao djelomično ili potpuno ionizirajući plin, kvazineutralan, a sastoji se od elektrona, pozitivno i negativno nabijenih iona, slobodnih radikala, atoma i molekula u osnovnom ili pobuđenom stanju te fotona UV zračenja (Misra i sur., 2016). Za nastajanje hladne plazme potrebno je česticama plina osigurati energiju iz vanjskog izvora, a to se postiže električnim pražnjenjem, koje nastaje između dvije elektrode priključene na vanjski izvor energije, pri čemu dolazi do ionizacije plina. Nastalo električno polje uzrokuje privlačenje elektrona prema pozitivno nabijenoj elektrodi (anodi), dok je pozitivna jezgra privučena od strane negativne elektrode (katode). Povećanjem napona, povećava se i naprezanje u atomima sve do dielektrične granice, kada se pojavljuje iskra kao posljedica formiranja električne veze između dvije elektrode. U drugoj fazi dolazi do naglog porasta jakosti struje, nakon čega slijedi električno pražnjenje, odnosno pad jakosti struje pri čemu se oslobađa energija - ta faza dovodi do stvaranja lokalizirane plazme (Boussetta i Vorobiev, 2014). Boja plazme ovisi o plinu koji se koristi, a nastaje kao posljedica povratka elektrona iz pobuđenog u osnovno stanje pri čemu se emitira energija u vidljivom dijelu spektra. U laboratorijskoj primjeni najčešće korišteni plinovi su argon, dušik, ugljikov dioksid i helij (Fridman, 2008).

Kada se stanica nađe u električnom polju, javlja se fenomen elektroporacije, tj. otvaraju se pore stanične membrane pri čemu se iz stanice oslobađaju biomolekule. Visokonaponsko električno pražnjenje između dviju elektroda u otopini prikazano je na Slici 5. Električni izboji nastali uslijed visokonaponskog električnog pražnjenja izazivaju oštećenje strukture stanica i fragmentaciju čestica te dovode do stvaranja turbulencije u otopini, UV svjetla visokog intenziteta, vodikovog peroksida (H_2O_2), kavitacijskih mjehurića i sekundarnih udarnih valova.



Slika 5. Visokonaponsko pražnjenje između dviju elektroda u otopini (Rajha i sur., 2015)

Formiranje električnog pražnjenja sastoji se od dvije različite faze - prve „streamer“ i druge „arc“ faze. Elektrovodljivi kanal ioniziranog plina formira se tijekom prve faze, a pri prelasku iz prve u drugu fazu naglo raste jačina struje, nakon čega dolazi do električnog pražnjenja, odnosno pada jačine struje pri čemu se oslobađa energija. Upravo „arc“ faza dovodi do stvaranja lokalizirane plazme. Odnos napona, struje i energije sustava prikazan je na Slici 6. Za vrijeme „arc“ faze također dolazi do formiranja udarnih valova visokog tlaka (90-100 bar) koji mogu dovesti do oštećenja stanica biološkog materijala te nastanka hidroksilnih radikala. Nakon formiranja udarnih valova dolazi do formiranja refrakcijskih valova koji su odgovorni za nastajanje kavitacijskih mjehurića. Nastali kavitacijski mjehurići ispunjeni su plinom te njihovim pucanjem dolazi do stvaranja sekundarnih udara i turbulencije te slabljenja tj. rupture staničnih struktura zbog električnog pražnjenja.



Slika 6. Odnos napona, struje i energije električnog pražnjenja (Boussetta i Vorobiev, 2014)

Netoplinska tehnika visokonaponskog električnog pražnjenja omogućava povećanje brzine i prinos ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala s minimalnim utroškom energije. Za uspješnost ove metode i rezultate sa što većim prinosima potrebno je osigurati optimalne uvjete ekstrakcije - napon, temperaturu i vrijeme trajanja, u skladu s materijalom koji se tretira i ciljanom komponentom koju želimo ekstrahirati (Boussetta i sur., 2012).

Roselló-Soto i sur. (2015) pokazali su superiornost HVED tretmana nad ultrazvukom i pulsirajućim električnim poljem u smislu unosa energije, učinkovitosti te vremenu tretmana za ekstrakciju proteina iz koštica masline.

5. Zero Waste

Prehrambena industrija je jedna od najvažnijih grana nacionalnih gospodarstva, kako u Europskoj uniji tako i u svijetu općenito. Ova industrija se mijenjala i razvijala desetljećima kako bi se zadovoljile potrebe potrošača. Situacija se drastično promijenila, pogotovo u 20. stoljeću, kao rezultat industrijalizacije, tehnoloških inovacija, mehanizacije, ekonomskog rasta kao i povećanje svjetske populacije. Sve to, zajedno je utjecalo na povećanje nastale količine otpada. Otpad hrane je jedan od većih globalnih problema koji se odvija duž cijelog lanca opskrbe hranom. Nastaje nakon žetve, tijekom proizvodnje i prerade hrane, te završava s potrošačima. Podatci pokazuju da globalno između 30 i 50 % ukupno proizvedene hrane otpada te da 57 % voća i povrća također otpada dok se samo 43 % konzumira. S druge strane javljaju se zabrinjavajući podatci od strane Organizacije za hranu i poljoprivredu (eng. Food and Agriculture Organization, FAO), koji su nedavno procijenili da je 843 milijuna ljudi, gotovo sedmina svjetske populacije, kronično gladno, a veći broj ljudi također pati od nedostatka hranjivih tvari. Stoga se interes okreće prema "Zero waste" proizvodnji.

Zero waste je koncept koji je etičan, ekonomičan, učinkovit, te mu je cilj da se promjeni životni ciklus nekog proizvoda i da se on nakon prvog kraja životnog ciklusa ponovno upotrijebi na neki način. Predstavlja oblikovanje i upravljanje proizvodima i procesima kako bi se sistematski izbjegavala i eliminirala velika količina otpada i materijala te kako bi očuvali i oporavili sve resurse, a ne ih zapalili ili zakopali na odlagalištima. Temelji se ne samo na recikliranju i ponovnoj upotrebi, već i na restrukturiranju proizvodnje te sustava distribucije u svrhu smanjenja količine otpada. Zbog prevelike ekstrakcije resursa iz prirode te količine materijala koji se koriste u proizvodnji raznih proizvoda, izvori postaju

ograničeni. Zbog toga je važno da se do sada linearni sustav upravljanja otpadom pretvori u kružni sustav kod kojeg je veća učinkovitost uporabe materijala, proizvoda i tvari te je cilj takvog sustava otpad prenamijeniti u neki drugi koristan oblik. Time se ujedno potiče održivi razvoj i štiti okoliš, te smanjuju se troškovi (Vidović Popek, 2018).

6. Održivost

Posljednjih godina, otpad od hrane postao je globalna briga i predstavlja znatne izazove za sigurnost hrane, prirodne resurse, okoliš i zdravlje ljudi, te se stoga smatra ključnom preprekom održivom razvoju. U rujnu 2015., Opća skupština Ujedinjenih naroda usvojila je međunarodni okvir za usmjeravanje globalnih razvojnih napora pod nazivom: „Transformiranje našeg svijeta: Agenda za održivi razvoj 2030.“. Agenda uključuje 17 ciljeva održivog razvoja i 169 ciljeva koji se odnose na globalne izazove. Među kojima je cilj 2, „Okončati glad, postići sigurnost hrane i poboljšanu prehranu te promovirati održivu poljoprivredu“. Jedan od njegovih ciljeva je: „do 2030. osigurati održive sustave proizvodnje hrane i implementirati otporne poljoprivredne prakse koje povećavaju produktivnost i proizvodnju, koje pomažu u održavanju ekosustava, koje jačaju sposobnost prilagodbe klimatskim promjenama, ekstremnim vremenskim uvjetima, suši, poplavama i drugim katastrofama i da progresivno poboljšati kvalitetu zemljišta i tla“ (Frais i sur., 2020). Sustav održive hrane u središtu je ciljeva održivog razvoja Ujedinjenih naroda (eng. *Sustainable Development Goals*, SDG). Da bi se ostvarili SDG-ovi, globalni prehrambeni sustav treba preoblikovati kako bi bio produktivniji, ekološki održiv, te sposoban svima pružiti zdravu i hranjivu prehranu. To su složeni i sustavni izazovi koji zahtijevaju kombinaciju međusobno povezanih djelovanja na lokalnoj, nacionalnoj, regionalnoj i globalnoj razini (Nguyen, 2018). U današnje vrijeme, globalni prehrambeni sustav, sastavljen je od mnogih uzastopnih koraka od poljoprivredne proizvodnje pa do potrošača. Posebno je bio istražen utjecaj poljoprivredne proizvodnje na okoliš, pokazujući između ostalog da je odgovoran za oko 1/4 emisije svih stakleničkih plinova iz ljudskih aktivnosti. Osim toga, oko 25 % potrošnje vode u svijetu pripisano je preradi hrane, a također je odgovoran za najveći doprinos emisiji organskih otpadnih tvari u vodi. Štoviše, oko 30-50 % proizvedene hrane postaje otpad, tome najviše doprinose voće, povrće, žitarice i proizvodi od žitarica kroz cijeli lanac opskrbe hranom. Vodeni, atmosferski i kruti otpad posljedica su procesiranja hrane te utječu na okoliš, stoga su inicijative okrenute prema 3 glavne osi:

potrošnja energije, korištenje vode i smanjenje krutog otpada ili njegovo cirkularno korištenje. Povećanje cijene energije navodi tvrtke za proizvodnju hrane da ulažu u bolje upravljanje energijom. S obzirom na to toplinski procesi okarakterizirani su kao energetski najpotrošnije tehnologije u prehrambenoj industriji. Posljedično tome, netoplinski procesi dobile su na važnosti posljednjih nekoliko desetljeća kao održiva alternativa konvencionalnoj preradi hrane zbog smanjene potrošnje energije i vode tijekom obrade, ali i smanjenjem korištene energije tijekom skladištenja. Neizravni učinci netoplinske prerade se također očituju kao doprinos smanjenju krutog otpada (Picart-Palmade i sur., 2019).

7. ZAKLJUČAK

Potreba za obnovljivim i održivim izvorima proteina raste. Prehrana koja sadrži više biljnih proteina raste zbog negativnih utjecaja životinjskih proteina na okoliš poput povećane emisije stakleničkih plinova i prekomjernog korištenja vode, te sve to dovodi do rastućih trendova vegetarijanstva i veganstva. Zbog toga se fokus okreće prema biljkama kao izvor proteina, poput šećerne repe. Šećerna repa je važna kultura u gotovo svim europskim zemljama te njezino potpuno iskorištenje treba ispitati u kontekstu održivog razvoja na ekonomski isplativ, ekološki i etičan način. Pojavilo se niz različitih tehnika s velikim potencijalom za pomoć pri ekstrakciji proteina zbog njihovog potencijala da smanje utjecaj proizvodnje hrane na okoliš, poboljšaju sigurnost hrane i donesu dobrobit potrošačima.

1. Primjena pulsirajućeg električnog polja (PEP) tretman je jedan od glavnih netoplinskih procesa koji se koriste u prehrambenoj industriji i proizvodnji nutraceutika. Uspjeh ovog procesa povezan je s njegovom kontinuiranom operativnošću tijekom kratkog provođenja procesa. Permeabilizirajući stanične membrane na relativno niskim temperaturama, PEF tretman je koristan alat za zaštitu termolabilnih spojeva od razgradnje. Nadalje, vrlo je selektivan i omogućuje oslobađanje topivih unutar staničnih tvari, dok primjena otapala, potrebnih za konvencionalne metode, zahtijeva daljnje korake pročišćavanja. Međutim, glavna briga za komercijalizaciju PEF-a je relativno visoka cijena instalacije za industrijske procese te postoje ograničenja kod obrade krute hrane.
2. Ultrazvuk (UZ) je alternativna, pristupačna, učinkovita, jednostavna i jeftina metoda za poboljšani oporavak nutritivno vrijednih spojeva iz različitih biljnih materija. Ova tehnika se može koristiti samostalno i/ili u kombinaciji s konvencionalnom metodom ekstrakcije i zahtijeva niske kapitalne troškove. Štoviše, ova metoda može koristiti niže temperature, pa je tako potencijalna alternativa za očuvanje termolabilnih spojeva. Osim toga, može minimizirati potrošnju otapala, dopuštajući korištenje zelenih otapala. Međutim, ultrazvučna ekstrakcija proteina je vrlo specifična za supstrat, npr. supstrat s česticama veće veličine je osjetljiviji na ultrazvuk nego supstrat s česticama manje veličine. Ultrazvučni valovi visokog intenziteta dovode do fizičkog oštećenja tkiva zbog velike snage kojom djeluju na uzorak. To su i osnove ove tehnike u različitim procesima prerade i konzerviranja hrane. Za razliku od njih ultrazvučni valovi niskog intenziteta

koriste se za analitičke svrhe za određivanje sastava, strukture ili viskoznosti hrane, jer ne dovode do fizičkog oštećenja uzorka.

- Ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem (HVED) omogućuje ekstrakciju spojeva pri niskom utrošku energije u usporedbi s drugim nekonvencionalnim tehnikama (npr. PEP i UZ), kao i smanjenje potrebne temperature difuzije, vremena ekstrakcije i količine otapala. Međutim, HVED ekstrakcija unutar staničnih spojeva pokazala je ograničenja u usporedbi s PEP-om. Dodatno, HVED tretman obično uključuje fragmentaciju biljnog matriksa i oslobađanje malih čestica, koje zahtijevaju dodatno pročišćavanje.

8. POPIS LITERATURE

Adetunji, L.R., Adekunle, A., Orsat, V., Raghavan, V. (2017) Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: a review. *Food Hydrocolloids* **62**, 239-250. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.015>

Alexandre, E. M. C., Pinto, C. A., Moreira, S. A., Pintado, M., & Saraiva, J. A. (2019) Nonthermal food processing/preservation technologies. *Saving Food*, Academic Press, str. 141–169.

Alexandre, E.M.C., Ina'cio, R.S., Ribeiro, C., Castro, S.M., Teixeira, P., Pintado, M. (2017) Effect of Commercial Emerging Non-Thermal Technologies on Food Products: Microbiological Aspects. In *Food Safety and Protection*. CRC Press, Taylor and Francis.

Andersson, I., & Backlund, A. (2008) Structure and function of RuBisCO. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.01.001>

Andersson, I., & Taylor, T. C. (2003) Structural framework for catalysis and regulation in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **414**, 130–140. [https://doi.org/10.1016/s0003-9861\(03\)00164-4](https://doi.org/10.1016/s0003-9861(03)00164-4)

Awad, T.S., Moharram, H.A., Shaltout, O.E., Asker D., Youssef, M.M. (2012) Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review, *Food Research International*, **48**, 410-427. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.004>

Bals, B., Dale, B. E., Balan, V., Bergeron, C., Carrier, D. J., & Ramaswamy, S. (2012) Recovery of leaf protein for animal feed and high-value uses Biorefinery CoProducts, John Wiley & Sons, Hoboken, str. 179-197.

Beck, C. B. (2005) An Introduction to Plant Structure and Development, University Press, Cambridge, *Annals of Botany*, **97**, 1158. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl075>

Berg, J. M., Tymoczko J., Stryer L. , Weygand-Đurašević I. (2013) Biokemija. Zagreb: Školska knjiga, str. 567.

Berlowska, J., Binczarski, M., Dziugan, P., Wilkowska, A., Kregiel, D., Witonska, I. (2018) Sugar Beet Pulp as a Source of Valuable Biotechnological Products, Academic Press, Lodz, str. 359-392.

Boussetta, N., Reess, T., Vorobiev, E., Lanoiselle', J. L. (2012) Pulsed electrical discharges: principles and application to extraction of biocompounds, U: Enhancing extraction processes in the food industry (Lebovka, N., Vorobiev, E., Chemat F., ured.), Taylor & Francis – CRC Press, 145–172.es on polyphenol extraction from vine shoots. *Innov. Food Sci. Emerg.* **31**, 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.07.006>

Boussetta, N., Vorobiev, E. (2014) Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *C. R. Chimie.* **17**, 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2013.11.011>

Coustets, M., Teissié, J. (2016) The use of pulsed electric fields for protein extraction from Nanochloropsis and Chlorella. In T. Jarm, & P. Kramar (Vol. Eds.), U: Proceedings of the 1st World congress on electroporation and pulsed electric fields in biology, medicine and food & environmental technologies., IFMBE Proceedings: **53**, str. 405–408.

Ebringerova', A., Hroma'dkova', Z. (2010) An overview on the application of ultrasound in extraction, separation and purification of plant polysaccharides. *Central Eur. J. Chem.* **8**, 243-257. <https://doi.org/10.2478/s11532-010-0006-2>

Fraisl, D., Campbell, J., See, L. (2020) Mapping citizen science contributions to the UN sustainable development goals. *Sustain Sci* **15**, 1735–1751 <https://doi.org/10.1007/s11625-020-00833-7>

Fred van de Velde (2011) From waste product to food ingredient: The extraction of abundant plant protein RuBisCO– New Food Magazine, <https://www.newfoodmagazine.com/article/4461/from-waste-product-to-food-ingredient-the-extraction-of-abundant-plant-protein-RuBisCO/> Pristupljeno 3. lipnja 2022.

Fridman, A. (2008) *Plasma Chemistry*, Cambridge University Press, Cambridge, str. 1-11.

Gaweł, E. (2012) Chemical compositions of lucerne leaf extract (EFL) and its applications as a phytobiotic in human nutrition. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, **11**, 303-309. https://www.food.actapol.net/pub/10_3_2012.pdf

Hernández, T., Martínez, C., Hernández, A., & Urbano, G. (1997) Protein quality of alfalfa protein concentrates obtained by freezing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 797-802. <https://doi.org/10.1021/jf960347e>

Jelinić, J. (2020) 'Primjena novih tehnologija za ekstrakciju polifenola iz komine borovnice', (diplomski rad), Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek

Knorr, D., Froehling, A., Jaeger, H., Reineke, K., Schlueter, O., Schoessler, K. (2011) Emerging technologies in food processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, **2**, 203–235. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124129>

Li, H., Zhu, K., Zhou, H., Peng, W., & Guo, X. (2016) Comparative study of four physical approaches about allergenicity of soybean protein isolate for infant formula. *Food and*
21

Agricultural Immunology, **27**, 604–623. <https://doi.org/10.1080/09540105.2015.1129602>

MacAdam, J. W. (2011) Structure and function of plants. John Wiley & Sons, Hoboken

Misra, N. N., Schlüter, O., Cullen, P. J. (2016) Plasma in food and agriculture. U: Cold plasma in food and agriculture fundamentals and applications, Academic Press, London, str. 1-17.

Nguyen, H. (2018) Sustainable food systems Concept and framework, Agricultural Development Economics Division, FAO, <https://www.fao.org/3/ca2079en/CA2079EN.pdf>
Pristupljeno 3. lipnja 2022.

O'Brien, W. D., Jr (2007) Ultrasound-biophysics mechanisms. *Progress in biophysics and molecular biology*, **93**(1-3), 212–255. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.010>

Parry, M. A. J., Andralojc, P. J., Mitchell, R. A. C., Madgwick, P. J., & Keys, A. J. (2003) Manipulation of RuBisCO: The amount, activity, function and regulation. *Journal of Experimental Botany*, **54**:1321–1333. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg141>

Picart-Palmade, L., Cunault, C., Chevalier-Lucia, D., Belleville, M.-P., Marchesseau, S. (2019) Potentialities and Limits of Some Non-thermal Technologies to Improve Sustainability of Food Processing. *Frontiers in Nutrition*, **130**:5, <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00130>

Preece, K. E., Hooshyar, N., Krijgsman, A., Fryer, P. J., & Zuidam, N. J. (2017) Intensified soy protein extraction by ultrasound. *Chemical Engineering and Processing*, **113**, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2016.09.003>

Rajha, H., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., Vorobiev, E. (2015) Electrical, mechanical and chemical effects of high-voltage electrical discharges on the polyphenol extraction from vine shoots. *Innovative food science & emerging technologies*, **31**,60-66. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.07.006>

Roselló-Soto, E., Barba, F. J., Parniakov, O., Galanakis, C. M., Lebovka, N., Grimi, N., et al. (2015) arniakov, O. *et al.* High Voltage Electrical Discharges, Pulsed Electric Field, and

Ultrasound Assisted Extraction of Protein and Phenolic Compounds from Olive Kernel, *Food and Bioprocess Technology*, **8**, 885–894. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1456-x>

Saldaña, G., Cebria'n, G., Abenzoza, M., Sa'nchez-Gimeno, C., A'lvarez, I., Raso, J. (2017) Assessing the efficacy of PEF treatments for improving polyphenol extraction during red wine vinifications. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **39**,179-187. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.12.008>

Spreitzer, R. J., Salvucci, M. E. (2002) RUBISCO: Structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology*, **53**, 449–475. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135233>

Tabita, F. R., Satagopan, S., Hanson, T. E., Kreel, N. E., & Scott, S. S. (2007) Distinct form I, II, III, and IV RuBisCO proteins from the three kingdoms of life provide clues about, RuBisCO evolution and structure/function relationships. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 1515–1524. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm361>

Tenorio, A.T. (2017) Sugar beet leaves for functional ingredients.(doktorski rad), Wageningen University, Wageningen

Tiwari, B.K. (2015) Trends in analytical chemistry ultrasound : a clean, green extraction technology. *Trends Anal. Chem.* **71**, 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>

Vidović Poppek, I. (2018) 'Procjena životnog ciklusa prehrambenog proizvoda-zero waste', (završni rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Whitney, S. M., Houtz, R. L., & Alonso, H. (2011) Advancing our understanding and capacity to engineer nature's CO₂-sequestering enzyme, RuBisCO. *Plant Physiology*, **155**, 27–35. <https://doi.org/10.1104/pp.110.164814>

Yan, L.G., He, L., Xi, J. (2017) High intensity pulsed electric field as an innovative technique for extraction of bioactive compounds - a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57** (13), 2877-2888. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077193>

Yang, X., Li, Y., Li, S., Oladejo, A. O., Wang, Y., Huang, S., et al. (2017) Effects of low power density multi-frequency ultrasound pretreatment on the enzymolysis and the structure characterization of defatted wheat germ protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, **38**, 410–420. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.001>

Yu, X., Bals, O., Grimi, N., & Vorobiev, E. (2015) A new way for the oil plant biomass valorization: Polyphenols and proteins extraction from rapeseed stems and leaves assisted by pulsed electric fields. *Industrial Crops and Products*, **74**, 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.045>

Zhu, K. X., Sun, X. H., & Zhou, H. M. (2009) Optimization of ultrasound assisted extraction of defatted wheat germ proteins by reverse micelles. *Journal of Cereal Science*, **50**, 266–271. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.06.006>

Izjava o izvornosti

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

Vlastoručni potpis