

Valorizacija lišća šećerne repe i metode analize RuBisCO a

Kovačiček, Sven

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:159:957070>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-03**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Sven Kovačiček
7817/PT**

**VALORIZACIJA LIŠĆA ŠEĆERNE REPE
I
METODE ANALIZE RUBISCO-A
ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:
PRIMA H2020 GA2032, FunTomP – Functionalized Tomato Products**

Mentor: prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Zagreb, 2022.

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

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

ZAHVALA

Najljepše se zahvaljujem svojoj mentorici, prof.dr.sc. Anet Režek Jambrak, na prenesenom znanju i vrijednim savjetima te isto tako na velikoj pomoći i potpori prilikom izrade ovog rada.

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

Valorizacija lišća šećerne repe

i

metode analize RuBisCO -a

Sven Kovačiček, 7817/PT

Sažetak: Povećana proizvodnja hrane, i tehnološka revolucija bez naglaska na povećanju učinkovitosti postupaka prerade bila je uobičajena praksa do početka 21. stoljeća te je kao takva imala izrazito štetan utjecaj na okoliš. U današnje vrijeme prehrambena industrija primorana je primijeniti nove strategije, kao što je npr. valorizacija nusproizvoda, kako bi smanjila proizvodnju otpada i potrošnju energije na ekološki prihvatljivu razinu. Lišće šećerne repe se prema dosadašnjim istraživanjima iskazalo kao dobar alternativni izvor proteina. RuBisCO zbog svoje zadovoljavajuće nutritivne i tehno-funkcionalne vrijednosti pruža mogućnost približavanju ostvarivanja nekoliko ciljeva održivog razvoja. Prema Agendi 2030, omogućuje budućim generacijama da se lakše nose s posljedicama neizbježnih i ubrzanih klimatskih promjena koje prijete sigurnosti hrane za sve rastuću ljudsku populaciju. Cilj ovog rada bio je istražiti povezanost valorizacije listova šećerne repe s ciljevima održivog razvoja i analitičke metode kojima se dobiveni protein može učinkovito odrediti.

Ključne riječi: Valorizacija, lišće šećerne repe, RuBisCO, održivi razvoj

Rad sadrži: 27 stranica, 7 slika, 1 tablicu, 49 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

Pomoć pri izradi: prof.dr.sc. Anet Režek Jambrak

Datum obrane: srpanj 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

Valorisation of sugar beet leaves
and
analytical methods of RuBisCO protein
Sven Kovačiček, 7817/PT

Abstract: Increasing production of food without stressing the importance of increasing production efficiency was the prevalent policy up until the beginning of the 21st century and as such it had a harmful effect on the environment. Nowadays, the food industry is required to implement new strategies, such as valorisation of by-products, to help lessen its waste production and energy demands to an environmentally friendly level. According to research, sugar beet leaves have shown to be a great alternative source of protein. RuBisCO, because of its satisfactory nutritional and techno-functional values, gives the world a chance to get closer to achieving the sustainability goals of the Agenda 2030 and with it the chance for future generations to bear the inevitable climate change with ease which threatens the food security of the ever-growing population. The goal of this undergraduate thesis was to give an insight into the relation of valorisation of sugar beet leaves and sustainability goals as well as into some analytical methods with which this protein can be efficiently analysed.

Keywords: Valorisation, sugar beet leaves, RuBisCO, sustainable development

Thesis contains: 27 pages, 7 figures, 1 table, 49 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: July 2022.

Sadržaj

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. RuBisCO	2
2.2. METODE ANALIZE RuBisCO-A	6
2.2.1. KVALITATIVNE METODE ANALIZE	6
2.2.2. KVALITATIVNE METODE ANALIZE	8
2.3. LISTOVI ŠEĆERNE REPE	10
2.4. VALORIZACIJA.....	11
2.5. ODRŽIVI RAZVOJ I CILJEVI ODRŽIVOG RAZVOJA.....	15
3.ZAKLJUČCI.....	19
4.POPIS LITERATURE	21

1. UVOD

Proizvodnja i procesiranje hrane jedni su od najvažnijih temelja i pokretača održivog razvoja. U kontekstu prehrambene industrije, održivi razvoj podrazumijeva najbolju iskoristivost ulaznog proizvoda i efikasnost proizvodnih procesa pri čemu se maksimalno minimalizira štetan utjecaj proizvodnje na okoliš, a samim time i na zdravlje ljudi. Valorizacija nusproizvoda jedna je od inovativnih strategija kojom se čovječanstvo može približiti postizanju opisanog načina proizvodnje.

Procjenjuje se kako bi svjetska populacija do 2050. godine mogla premašiti 9 milijardi stanovnika. Potražnja za hranom zadovoljavajuće nutritivne vrijednosti odnosno hranom koja pruža dobar izvor proteina već i sada predstavlja izazov za prehrambenu industriju. Mliječna i mesna industrija jedni su od najistaknutijih zagađivača okoliša, ali su isto tako i zasad najbolji izvori hrane bogate cjelovitim proteinima. Iz navedenih razloga znanost se desetljećima trudi pronaći održiviji alternativni izvor proteina. Jedan od obećavajućih alternativnih izvora proteina čine upravo listovi. Listovi predstavljaju nusproizvod koji obično biva odbačen već pri žetvi sirovine na polju ili pri čišćenju ulazne sirovine u primarnoj fazi industrijske obrade. Proteinsku frakciju listova većinom čini protein RuBisCO koji ima ključnu ulogu u Calvinovom ciklusu. To je prilično velik protein i smatra proteinom u najvećem izobilju na svijetu (Ellis, 1979).

Šećerna repa jedna je od najbitnijih biljaka u prehrambenoj industriji s obzirom na čestu primjenu u proizvodnji šećera. Tijekom žetve listovi šećerne repe bivaju odbačeni već na polju. Čine i do 34% šećerne repe te količina odbačenih listova po jednom hektaru iznosi i po nekoliko tona te predstavljaju nusprodukt s obećavajućim sastojcima. Valorizacijom ovog lista prehrambena industrija može dobiti novi izvor održivijih funkcionalnih sastojaka s naglaskom na sve traženije proteine.

Cilj ovog rada bio je pružiti kratki osvrt na teme valorizacije i održivog razvoja te predstaviti valorizaciju lista šećerne repe kao efektivnu strategiju dobivanja alternativnog, zelenog, održivog izvora proteina i analitičke metode kojima se bi se mogli pratiti procesi dobivanja čišće i vrijednije proteinske frakcije.

2. TEORIJSKI DIO

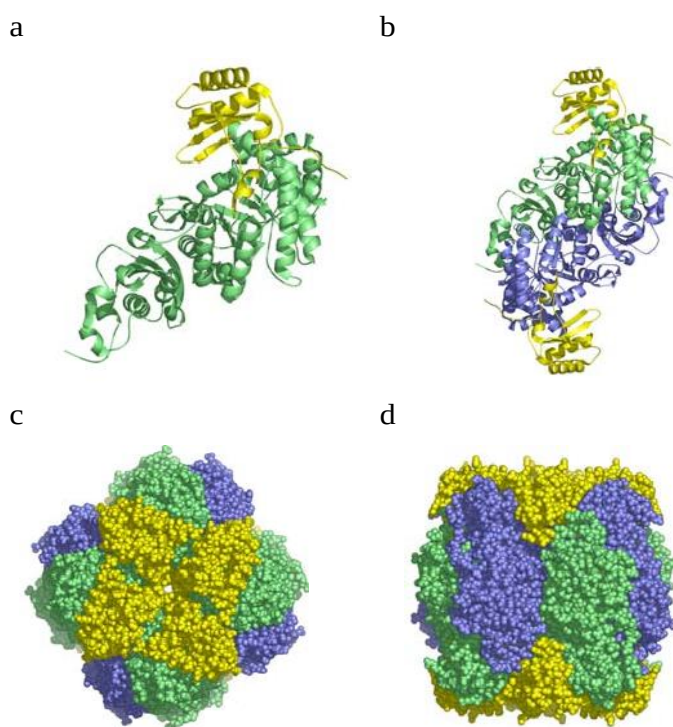
2.1. RuBisCO

Ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza, među biolozima i biokemičarima poznatiji pod skraćenim nazivom RuBisCO, jedan je od najznačajnijih (ako ne i najznačajniji) enzima u prirodi, a nalazi se u svim fotosintetskim organizmima. Značajan je iz razloga što predstavlja ulaznu točku ugljikovog dioksida u biosferu te se pretpostavlja kako su gotovo svi ugljikovi atomi prisutni u živim organizmima jednom prošli kroz aktivno mjesto ovog enzima (Mohorović, 2014).

Unutar biljnih stanica nalaze se specifični organeli zvani kloroplasti. Zahvaljujući složenim sustavima unutar klorofila, djelovanjem svjetlosne energije fotona dolazi do pobuđivanja elektrona, što uzrokuje niz reakcija između proteinskih kompleksa (Berg i sur., 2007). Kloroplasti sadrže unutarnju i vanjsku membranu, a u unutrašnjosti (na strani strome tilakoidnih membrana) se nalaze topljivi enzimi, čiju većinu čini RuBisCO (Spreitzer i Salvucci, 2002). Važno je napomenuti kako se RuBisCO smatra najzastupljenijim proteinom u prirodi (Ellis, 1979). Proračun ukupne količine RuBisCO-a aproksimiran je na sljedeći način (Ellis 1979; Woodwell 1978): ukupna količina fiksiranog ugljika odnosno apsorbiranog od strane kopnenih biljaka godišnje iznosi otprilike 50×10^{15} g, pomoću te informacije se dalje može približno izračunati količina RuBisCO-a (koja iznosi 4×10^{13} g) iz obrtnog broja njegove aktivnosti, naposljetku (uz pretpostavku da ukupna količina biomase na Zemlji iznosi 2×10^{19} g i da je 0,1% biomase sačinjeno od proteina) dolazi se do omjera RuBisCO-a i ukupne količine proteina u biomasi koji iznosi 4×10^{13} g / 2×10^{16} g odnosno 0,2%, što ga čini proteinom u najvećem izobilju. Ovoj aproksimaciji u prilog ide i činjenica kako RuBisCO može sačinjavati i do 50% ukupnih topljivih proteina u kloroplastu (Dhingra i sur., 2004). Također, kopnene biljke moraju preraspodijeliti i do 50% dušika u listu prema sintezi RuBisCO-a (Spreitzer i Salvucci, 2002).

RuBisCO se u prirodi nalazi u četiri oblika (I, II, III, IV), a oblik I je evolucijski najnapredniji te je karakterističan za stanice viših biljaka (Stefano i sur, 2018). Za potrebe ovoga završnog rada u primarnom fokusu biti će RuBisCO tipa I. U ovom obliku se nalazi

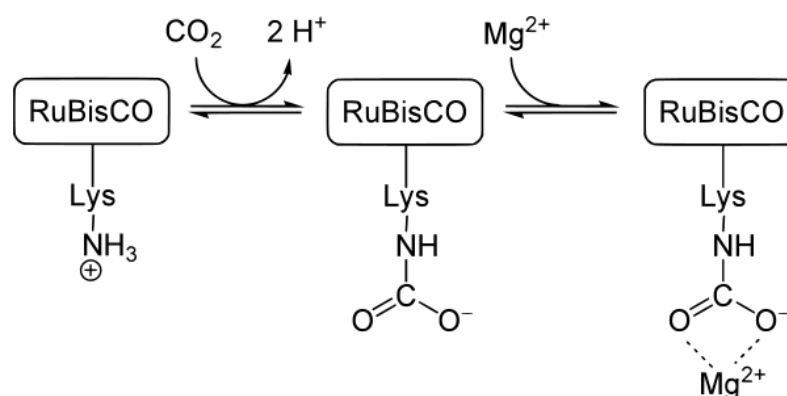
predominantna količina RuBisCO-a te se i, osim u višim biljkama, nalazi u ostalim kopnenim i morskim biljkama, eukariotskim algama, cijanobakterijama, a može se naći i u većine fototrofnih i kemolitoautotrofnih proteobakterija (Tabita, 1999). RuBisCO oblika I prilično je velik protein. Heksadekaderske je strukture, a sastoji se od osam velikih (L) i osam malih (S) podjedinica koje čine L8S8 strukturu (Tabita i sur., 2007). Na slici 1 prikazane su trodimenzionalne strukture podjedinica i cjelovitog enzima. Sam protein molarne je mase oko 550 kDa, dok se molarne mase podjedinica kreću oko 55 kDa za velike i 15 kDa za male podjedinice. Velike podjedinice imaju katalitičku ulogu provođenja specifične reakcije dok male podjedinice imaju ulogu u njihovoj regulaciji (Andersson, 2007).



Slika 1. Raspored podjedinica heksadekaderskog proteina RuBisCO-a. L podjedinice prikazane su zelenom i plavom bojom, a S podjedinice žutom. (a) Jedna L i jedna S podjedinica. (b) Dvije jedinice LS kompleksa. (c) Prikaz potpunog holoenzima (L8S8). (d) Prikaz holoenzima okomitog u odnosu na prikaz pod (c). (preuzeto i prilagođeno iz Karkehabadi, 2005)

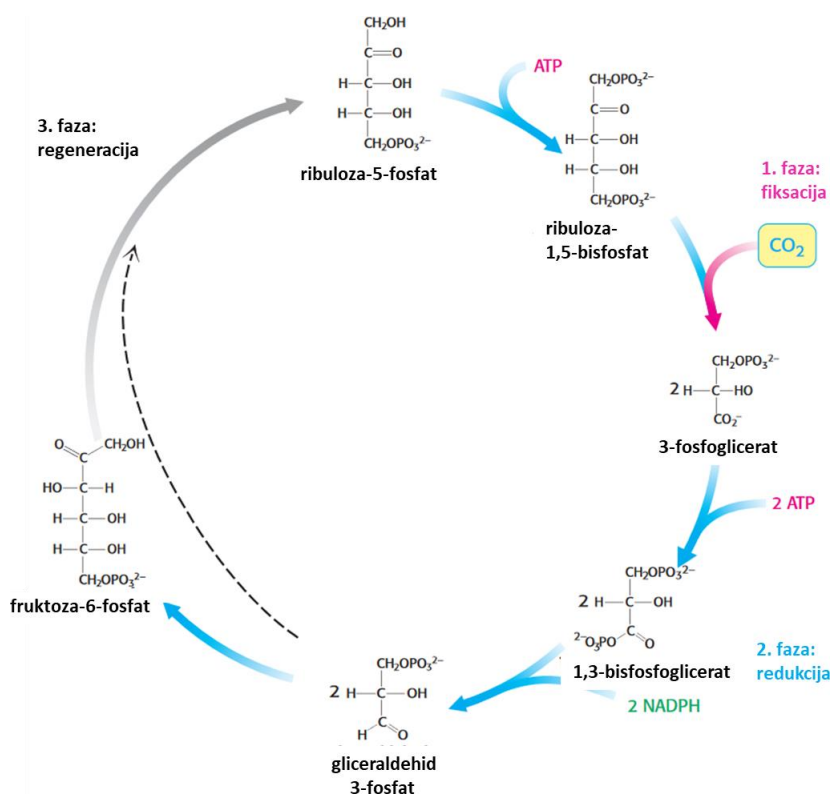
Niz nukleotida koji kodira za velike podjedinice sadržan je u genomu kloroplasta, a sama podjedinica se sintetizira na ribosomu u plastidima. Mala podjedinica je kodirana genima koji se nalaze u jezgri stanice te se sintetizira u citosolu (Andersson, 2007). Nakon translacije,

RuBisCO nema funkcionalno aktivno mjesto, već su potrebni odgovarajući aktivatori enzima, ioni Mn^{2+} i Mg^{2+} , te enzim RuBisCO aktivaza. Međutim, RuBisCO može vezati samo jedan od ovih iona u aktivno mjesto (Miziorko i Sealy, 1980). Vezanjem Mn^{2+} u RuBisCO-u dolazi do favorizacije u reakciji oksidacije, a ako se na aktivno mjesto veže Mg^{2+} veći je afinitet enzima za karboksilaciju (Lilley i sur., 2003). Za aktivnost je također neophodna molekula ugljikovog dioksida koji karboksilira pobočni ogranak specifičnog lizinskog ostatka (Lys_{201}) čime nastaje karbamat. Ovu reakciju katalizira enzim RuBisCO aktivaza. Negativni naboj karbamata omogućuje vezanje magnezija čime se proces aktivacije završava (Lorimer i sur., 1976). Na slici 2 prikazan je mehanizam aktivacije RuBisCO-a.



Slika 2. Mehanizam aktivacije RuBisCO-a (Lorimer i sur, 1976)

Nakon uspješnog procesa aktivacije RuBisCO-a, može započeti Calvinov ciklus. Calvinov ciklus se sastoji od tri faze (Berg i sur., 2007). Prva faza je faza fiksacije molekule ugljikovog dioksida na ribuloza-1,5-bisfosfat pri čemu nastaju dvije molekule 3-fosfoglicerata, u drugoj fazi nizom reakcija dolazi do redukcije nastalih 3-fosfoglicerata u šećer heksozu te se naposljetku u trećoj fazi odvija niz reakcija regeneracije ribuloza-1,5-bisfosfata (shematski prikaz na slici 3.). U prvoj se fazi Calvinovog ciklusa molekula ugljikovog dioksida kondenzira s molekulom ribuloza-1,5-bisfosfata u nestabilni međuspoj od šest ugljikovih atoma koji se zatim brzo hidrolizira u dvije molekule 3-fosfoglicerata. Upravo ovu reakciju katalizira enzim ribuloza-1,5-bisfosfat-karboksilaza/oksigenaza (RuBisCO). Nakon niza reakcija koje slijede u drugoj i trećoj fazi Calvinovog ciklusa, sintetizira se molekula glukoze koju biljke koriste kao izvor energije za anaboličke reakcije svojeg metabolizma.



Slika 3. Faze Calvinovog ciklusa (preuzeto i prilagođeno iz Berg i sur., 2007)

Rubisko osim reakcije karboksilacije, katalizira i nepoželjnu reakciju oksigenacije ribuloza-1,5-bisfosfata tako što umjesto ugljikovog dioksida u aktivno mjesto ulazi molekula kisika pa se nestabilni endiolatni međuprodukt u reakciji s kisikom prevodi u hiperoksidni međuprodukt čijim hidrolitičkim cijepanjem nastaju fosfoglikolat i 3-fosfoglicerat (Berg i sur., 2007). Oksigenazna funkcija RuBisCO je nepoželjna s obzirom na to da je štetna za samu biljku i smanjuje joj prinos (Foyer i sur., 2009). U uvjetima atmosfere koji su prisutni na Zemlji, RuBisCO katalizira dva do tri ciklusa karboksilacije na jednu reakciju oksidacije (Sharkey, 1998).

Istraživanja su pokazala da se aminokiselinski sastava velikih podjedinica RuBisCO-a, izoliranog iz različitih vrsta biljaka, malo razlikuje. Isto ne vrijedi i za male podjedinice ovog enzima koje se, od vrste do vrste, po aminokiselinskom sastavu razlikuju nešto više (Kawashima i Wildman, 1970). U prosjeku najzastupljenije aminokiseline su glicin, alanin i leucin te čine gotovo trećinu svih aminokiselina RuBisCO-a, dok su metionin, cistein i triptofan

najmanje prisutni, od kojih svaki pojedinačno čini oko 2% ukupnog aminokiselinskog sastava (Sevindik, 2017). Omjer kiselih (asparaginska i glutaminska kiselina) i bazičnih (histidin, asparagin i lizin) aminokiselina sugerira kako RuBisCO ima negativan neto naboj pri neutralnom pH te je blago kisela molekula. Kao i svim drugim proteinskim molekulama, topljivost mu je najmanja u području pH oko izoelektrične točke koja, ovisno o izvoru RuBisCO-a, varira između pH vrijednosti 4,4 i 4,7 (Barbeau i Kinsella, 1988). U posljednje vrijeme RuBisCO postaje sve interesantniji prehrambenoj i biotehnološkoj industriji zbog dosad dokazane dobre prehrambene vrijednosti, funkcionalnosti te in vitro probavljivosti (Martin i sur., 2019; Di Stefano i sur., 2018). Također, u svojoj nativnoj konformaciji sadrži nekoliko peptida bioaktivnih svojstava. Za ove peptide je potvrđeno da pokazuju razna blagodatna i korisna svojstva, što ukazuje na potencijalnu i obećavajuću mogućnost primjenjivosti ovog proteina u budućnosti ljudske prehrane i razvoja novih funkcionalnih proizvoda (Udenigwe i sur., 2017; Kobbi i sur., 2015; Yang i sur., 2003).

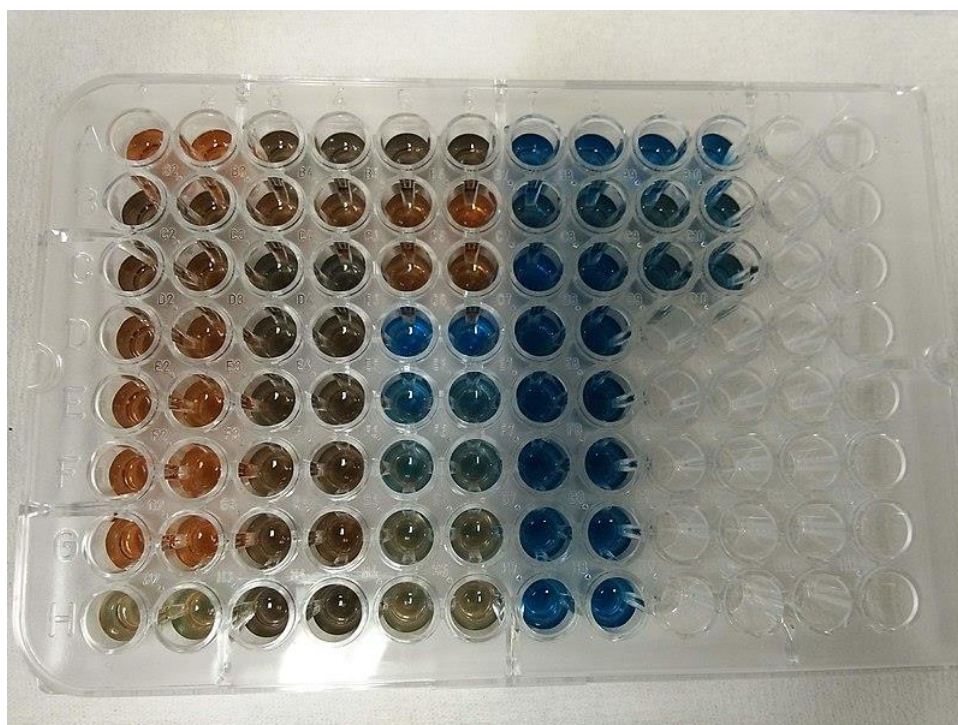
2.2. Metode analize RuBisCO-a

RuBisCO je protein te je, kao i u slučajevima istraživanja svih proteina, važna njegova kvalitativna i kvantitativna prisutnost u prethodno ekstrakcijom dobivenim uzorcima. U ovom odjeljku predstavljene su neke od metoda kojima bi se ovaj protein mogao na relativno lak i učinkovit način kvalitativno i kvantitativno analizirati.

2.2.1. Kvantitativne metode analize

UV spektrofotometrija vrsta je apsorpcijske spektroskopije koja se koristi mjerenjem apsorbancije u ultraljubičastom području elektromagnetskog spektra. Budući da je relativno jeftina i lako primjenjiva, ova metoda analize nalazi raznoliku praktičnu primjenu. Jedini zahtjev koji analizirana molekula mora ispunjavati je taj da apsorbira UV zračenje, primarno pri valnoj duljini od 280 nm. U ovom području apsorbiraju aromatski prsteni aminokiselina prisutni u npr. triptofanu i fenilalaninu. Problem kod ove metode je taj što bi se u analiziranom uzorku mogli nalaziti neki drugi proteini s većim udjelom aromatskih aminokiselina i nukleinske kiseline za koje je poznato da apsorbiraju ultraljubičasto zračenje te bi to dovelo do interferencija i krive interpretacije rezultata.

Metoda po Bradfordu je metoda određivanja koncentracije proteina koju obilježava vezanje boje Coomassie Brilliant Blue G-250 na proteinsku molekulu (Bradford, 1976). Razvio ju je Marion M. Bradford 1976. godine, a metoda se bazira na promjeni apsorbancije primijenjene boje. Boja postoji u tri oblika ovisno o svom naboju: crvene je boje kad je pozitivno nabijena, zelene kada nema naboja, a plava postaje kada dobije negativan naboj (Compton i Jones, 1985). Nadalje, u kiselim uvjetima boja je u duplo protoniranom crvenom kationskom obliku i ima maksimalnu apsorbanciju pri 470 nm. Vezanjem na protein, boja prelazi u stabilni deprotonirani plavi oblik koji ima maksimalnu apsorbanciju pri 595 nm koja se onda očitava na spektrofotometru (Sedmack i Grossberg, 1977; Reisner i sur., 1975). Procedura ove metode vrlo je jednostavna i lagana za provesti, a provodi se u jednom koraku tako da se Bradfordov reagens pomiješa s ispitivanim uzorkom u testnoj kiveti (Bradford, 1976). Nakon miješanja smjesa gotovo odmah poprimi plavu boju (Slika 4.) što nije čudno jer je jedna od najbržih metoda za analizu proteina, a traje manje od pola sata (Okutucu i sur., 2007).



Slika 4. Reakcija proteina i Bradfordovog reagensa (Anonymous 1, 2022)

Bradfordovu metodu ne ometa prisutnost nukleinskih kiselina i ostalih spojeva koji apsorbiraju elektromagnetno zračenje valne duljine 280 nm zato što boja povezana s proteinom ima maksimalnu apsorbanciju u vidljivom području odnosno pri 595 nm, a očitana apsorbancija je proporcionalna koncentraciji boje odnosno proteina (Ninfa i sur., 2010). Za baždarnu krivulju

koriste se otopine različite koncentracije BSA (bovine serum albumine), a slijepa proba je otopina samog reagensa bez proteina.

Biuret reakcija još jedna je metoda određivanja koncentracije proteina u analiziranom uzorku. Ova metoda je jedina koja nema ovisnost o aminokiselinskom sastavu proteina te joj to daje prednost u odnosu na druge metode (Shen, 2019). Bazira se na formiranju kompleksa bakrovih iona s proteinima odnosno s njihovim peptidnim vezama. Nastali kompleks oboji analiziranu otopinu u ljubičasto te ima apsorpcijski maksimum na 540 nm. Kao i kod već navedenih kvantitativnih metoda, intenzitet razvijene boje proporcionalan je koncentraciji proteina u uzorku. Za ovu analizu potrebno je pripremiti dva reagensa, Biuret reagens I i Biuret reagens II. Reagens I se pripremi na način da se 1,5 g bakrova (II) sulfata otopi u 250 mL destilirane vode te se u nastalu otopinu dodaju 4,5 g K-Na-tartarata i 2,5 g kalijeva jodida. Nastaloj otopini doda se 50 mL 6M otopine natrijeva hidroksida te se sve razrijedi na volumen od 500 mL. Nastala otopina plave je boje (Sesar, 2017). Reagens II je bezbojan i priprema se na gotovo isti način kao i reagens I, ali bez dodatka bakrova (II) sulfata.



Slika 5. Biuret reagens I (lijevo) i Biuret reagens II (desno) (preuzeto iz Sesar, 2017)

2.2.2. Kvalitativne metode analize

SDS-PAGE je vrsta elektroforeze pomoću koje se proteini mogu odvojiti odnosno razlikovati na temelju razlike u masi. U ovoj metodi proteine u analiziranom uzorku se tretira

detergentom natrijevim dodecil-sulfatom (SDS) koji nosi negativan naboj te svojim vezanjem prenosi negativan naboj na proteine i maskira njihov dotadašnji naboj. U pravilu se dodaje 1,4 g SDS-a na 1 g proteina (Smith, 1984). Tretiranjem SDS-om, proteini bivaju denaturirani što omogućava njihovo ravnomjerno kretanje kroz poliakrilamidni gel. Separacija se odvija u ćeliji za elektroforezu u kojoj se nalazi poliakrilamidni gel uronjen u pufersku otopinu i otopinu elektrolita. Pripremljeni uzorci otopina proteina tretiranih SDS-om pipetiraju se u jažice na vrhu gela. Nakon pripreme cijelog procesa kroz ćeliju za elektroforezu propusti se struja i negativno nabijeni proteini koji se nalaze u jažicama počinju se kretati prema dnu ćelije odnosno prema pozitivno nabijenoj anodi. Gel ima ulogu sita te omogućava lakši prolaz proteinima manje molekulske mase, dok veliki i teži proteini teže prolaze kroz gel i zaostaju blizu vrha. U prvu jažicu na gelu uobičajeno je nanijeti standard odnosno uzorak koji sadrži proteine poznate molekulske mase pomoću kojih se aproksimira masa proteina u ispitivanim uzorcima. Nakon provedene elektroforeze gel se mora tretirati bojom, a često se koristi Coomassie Brilliant Blue G-250 (Wilson, 1979). Razlog ovog tretiranja je taj što se odvojene linije proteina ne vide bez tretmana bojom. Ranije sam u radu naveo kako se RuBisCO sastoji od dvije podjedinice koje su različitih molekulskih masa. Prema tome bilo bi realno očekivati dvije odvojene frakcije ovog proteina na obojanom gelu.

ELISA je učinkovita i visoko specifična vrsta enzimskog imunotesta, a bazira se na postojanju specifičnih antitijela koja se vežu na antigen kojeg predstavlja protein iz uzorka koji želimo analizirati. Postoje četiri vrste ovog testa: direktna, „sandwich“, reverzna i kompetitivna ELISA. Provodi se na način da se prvo antigen ili antitijelo vežu za čvrstu imobiliziranu fazu. U slučaju da se antitijelo veže na imobiliziranu fazu govorimo o specifičnom vezanju antigena za tu fazu (Crowther, 1995). Tada možemo govoriti o „sandwich“ ELISA testu u kojem se na primarno antitijelo, vezano za stacionarnu fazu, specifično veže antigen (protein od interesa koji se nalazi u analiziranom uzorku). Nakon toga se kupelj ispire od ostatka nepotrebnih proteina te se nanosi otopina drugog specifičnog sekundarnog antitijela koje se veže za naš protein s „gornje“ strane. To antitijelo je povezano s posebnim enzimom. Dodatkom supstrata, specifičnog za enzim koji je vezan za sekundarno antitijelo, u pripremljenu smjesu enzim vezan za sekundarno antitijelo provodi reakciju koju prati optička promjena, tj. promjena boje. Promjena boje ukazuje nam na prisutnost proteina od interesa, ali nam i može dati informaciju o koncentraciji proteina pošto se obojena otopina može analizirati na spektrofotometru.

Prednost ove metode je velika specifičnost pošto se mogu nabaviti antitijela specifična za analizu RuBisCO-a. Jedini nedostatak je taj što je postupak skup.

2.3. Listovi šećerne repe

List šećerne repe (slika 6.) sačinjava 20-34% biljke. Nalazi se na glavi korijena, a rast, razvitak i održavanje zdravlja ovog biljnog organa su esencijalni procesi s obzirom na ulogu u izvršavanju reakcija fotosinteze i fiksacije ugljikovog dioksida posredovane enzimom RuBisC-Om u kojoj nastaju šećeri neophodni za prehranu biljke.

S obzirom na raspored listova kroz koji se stvara rozeta, rastom novih u sredini, najproduktivniji su srednji listovi jer imaju najveću aktivnu površinu u odnosu na mlade male listove i stare isušene. Aktivna površina podrazumijeva područje lista koje može vršiti fotosintezu kojom će opskrbljivati biljku šećerima (Højland and Pedersen, 1994).

Promatranjem kemijskog sastava, list šećerne repe sadrži neophodne nutrijente za funkcioniranje biljnih stanica, koji osim toga povoljno djeluju i na funkcioniranje ljudskog organizma. Među mineralnima se mogu naći kalij. Ključna sastavnica za normalnu funkciju klorofila i kloroplastnih pigmenata je magnezij, kojem udio suhe tvari u listu raste proporcionalno s rastom rozete (Sacala i sur., 2016). Listovi su također bogati i drugim mineralima kao što su npr. kalcij, željezo, fosfor i cink (Tamayo, 2017). Ekstrakti lista šećerne repe bogati su fitokemikalijama koje pokazuju antioksidacijsku aktivnost kao obrambeni odgovor protiv degradacije tkiva uzrokovane visoko reaktivnim kemijskim vrstama (slobodnim radikalima). U ekstraktima su detektirane fenolne kiseline, od kojih se istakao udio galične i ferulinske, te flavonoidi među kojima je najobilniji kvercetin (El Gengaihi i sur., 2016). List također sadrži vitamine i sekundarne metabolite fitoestrogene koji su prepoznati kao nutraceutici zbog blagotvornog djelovanja na ljudski organizam (Gawel, 2012).

Promatranjem proteinskog sastava lišća, udio proteina je neosušenom listu poprilično nizak i varira između 3% i 5% (Tamayo, 2017). Prisutni proteini mogu se podijeliti na topive i netopive. U biljnim stanicama, udio od gotovo 80% proteina se nalazi u kloroplastima, gdje imaju ulogu u pretvaranju svjetlosne energije u kemijsku kroz reakcije fotosinteze kako bi se

održala sposobnost biljke za život (Heinemann i sur., 2020). Među netopljive proteine ubrajaju se membranski proteini u tilakoidnim membranama kloroplasta te se mogu naći povezani s klorofilom, karotenoidima i lipidima. Netopivi membranski proteini stvaraju energiju kroz transportni lanac elektrona, a nastala energija omogućuje fiksaciju ugljikovog dioksida koja je katalizirana RuBisCOm, enzimom iz topljive frakcije koji čini gotovo polovicu svih topljivih proteina, te je najprisutniji enzim u biljnim stanicama (Barbeau i Kinsella, 1988).



Slika 6. Lišće šećerne repe (Anonymous 2, 2022)

2.4. Valorizacija

Valorizacija znači pridavati vrijednost nečemu. U kontekstu prehrambeno-agronomske industrije valoriziraju se nusproizvodi i odbačeni materijali za koje se prvotno smatralo da su višak. Nusprodukti agro-prehrambene industrije nastali tokom branja i prerade uključuju otpad poput: ljuski, zrna, lišća, stabljike, kore i slično. Dosad je glavna strategija zbrinjavanja ovih nusprodukata bilo njihovo odbacivanje i odlaganje na odlagalištima otpada gdje bi trunuli (Gomez-Garcia i sur., 2021). Razlog tomu je prekomjerna proizvodnja koja dovodi do prekomjerne količine otpadnih nusprodukata što u kombinaciji s manjkom održivog upravljanja otpadom dovodi do pretrpavanja odlagališta i nekontroliranog truljenja otpadne biomase. Također, nešto rjeđe korištena no jednako štetna strategija je spaljivanje nepotrebnih nusproizvoda kako bi se spriječilo nakupljanje nametnika i mikroorganizama. U današnje vrijeme ove su strategije prepoznate kao štetne, kako za okoliš tako i za ekonomske i socijalne aspekte proizvodnje. Naime, truljenjem prehrambenih otpadaka na odlagalištima kroz dulji period stvaraju se anaerobni uvjeti kompostiranja zbog čega kao jedan od produkata razgradnje nastaje metan. Metan ima ključnu ulogu u globalnom zagrijavanju jer je puno efektivniji u

zadržavanju topline u odnosu na češće spominjan ugljikov dioksid. Na sreću, u atmosferi ga ima u manjoj koncentraciji te se ne zadržava ni upola dugo kao i ugljikov dioksid, no to ne opravdava odlaganje otpada prehrambene industrije na odlagalištima. Nadalje, socijalni aspekt predstavlja spaljivanje otpada čime se oslobađaju toksični spojevi izgaranja u atmosferu što šteti standardu življenja zbog smanjena kvalitete zraka. Gubitak unesene sirovine u vidu odbačenih nusproizvoda predstavlja gubitak dijela energije i novaca utrošenih na transport i obradu primarne sirovine što za posljedicu ima nepoželjan utjecaj na ekonomski aspekt proizvodnje. U novije vrijeme nastali nusproizvodi prepoznati su kao sirovine visoke nutritivne vrijednosti koja proizlazi iz njihovog sastava kojeg djelomično čine funkcionalne i bioaktivne molekule za koje se zna da imaju blagodatna svojstva za ljudski organizam. Nusproizvodi prehrambene industrije mogu naći svoju primjenu u razvoju novih sastojaka prehrambenih proizvoda ili pak u razvoju potpuno novih proizvoda za ljudsku potrošnju. Iz tog se razloga industrija u novije vrijeme fokusira na primjenu raznih biotehnoloških procesa kojima bi se mogli valorizirati i iskoristiti potencijali nastalih nusproizvoda.

Za potrebu ovog završnog rada, kao primjer će se uzeti valorizacija nusprodukta nastalog pri obradi šećerne repe. Taj nusprodukt biva odbačen već na polju, a radi se o lišću šećerne repe. Već je ranije u ovom radu spomenuto kako lišće sačinjava 20-34% šećerne repe. U Hrvatskoj, godišnja proizvodnja šećerne repe iznosi oko 55 t/ha (Anonymous 3, 2022) što rezultira količinom od maksimalno 19 t/ha odbačenog lišća svake godine. Zabilježeno je da listovi šećerne repe mogu u prosjeku sadržavati i do 22,8 % sirovog proteina na suhoj bazi (Tamayo, 2017). U kontekstu proizvodnje u Hrvatskoj to bi značilo da je u odbačenom lišću šećerne repe prisutna količina od oko maksimalno 400 kg/ha proteina. Kao i svi ostali proteini, proteini šećerne repe mogu naći svoju potencijalnu primjenu u prehrambenoj industriji u vidu novog izvora proteina zadovoljive nutritivne vrijednosti (Tablica 1.), kao izvor bioaktivnih peptida za inkorporaciju u nove funkcionalne proizvode (Udenigwe i sur., 2017) ili pak u ulozi funkcionalnog sastojka prehrambenih proizvoda kao dodatak za geliranje, emulgiranje, pjenjenje i slično.

Aminokiseline su građevni blokovi proteina. Proteini pak imaju razne i izrazito važne uloge u funkcioniranju staničnih i izvanstaničnih procesa, a nedostatak jedne od esencijalnih aminokiselina može ograničiti sintezu proteina što naposljetku može prouzročiti niz zdravstvenih problema. Zato je kao izvor proteina važno konzumirati hranu koju odlikuje

povoljan sastav i omjer ovih aminokiselina. Kao što se može vidjeti u Tablici 1. (Barbeau i Kinsella, 1988), RuBisCO se odlikuje povoljnim sastavom esencijalnih aminokiselina te je djelomično usporediv s aminokiselinskim sastavom jajeta, koje se smatra jednim od najcjelovitijih izvora proteina.

Tablica 1. Usporedba sastava esencijalnih aminokiselina RuBisCO-a s referentnim vrijednostima FAO-a/WHO-a i nekoliko izvora visokovrijednih proteina (preuzeto i prilagođeno iz Barbeau i Kinsella, 1988).

Aminokiselina	FAO/WHO	Jaje	Kazein	Obrok od soje	RuBisCO	Biološka vrijednost
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 Cistin and 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

Kao i svi ostali proteini, RuBisCO se sastoji od peptida. Neki peptidi mogu imati biološki aktivnu ulogu odnosno mogu djelovati (većinom pozitivno) na biološke procese. Bioaktivni peptidi prepoznati su u svijetu prehrambene industrije kao visokovrijedni sastojci hrane zbog svoje dokazane blagodatne djelotvornosti na ljudski organizam te kao potencijalni dodaci za obogaćivanje nutritivne vrijednosti i pridavanje funkcionalne uloge konačnom proizvodu. Zasad, RuBisCO-vi bioaktivni peptidi pokazali su pozitivne učinke na zdravlje u *in vitro* ispitivanjima provedenim na kulturama stanica i pokusnim životinjama (Udenigwe i sur., 2017). Neki od učinaka i svojstava su: antihipertenzivno, antibakterijsko, antioksidacijsko, opioidno i probavno stimulirajuće. Peptidi RuBisCO-a antihipertenzivno djeluju na način da inhibiraju aktivnost ACE enzima čiji produkt, neinhibirane aktivnosti, u visokoj koncentraciji izaziva vazokonstrikciju što za posljedicu ima povišenje krvnog tlaka. Za peptid rubiscolin-6

dobiven iz špinata, dokazano je samostalno anksiolitičko djelovanje posredovano σ_1 i D_1 receptorima (Yang i sur., 2001).

Slobodni radikali i reaktivni oblici kisika nastaju kao produkti metabolizma i oksidativnog stresa stanica. U prevelikoj koncentraciji reaktivni oblici kisika prouzrokuju štetu na stanicama i tkivima na način da oksidiraju makromolekule poput lipida, proteina pa čak i nukleinske kiseline. Enzimatski hidrolizati RuBisCO-a 90 %-tne čistoće pokazali su dobar antioksidativni kapacitet, ovisno o dozi, u *in vitro* uvjetima inhibirajući oksidaciju linolne masne kiseline (Kobbi i sur., 2017). Neki od peptida sadržanih u hrani, osim antioksidacijskog, pokazuju i antimikrobno djelovanje (Haque i Chand, 2008) i tako pružaju moguću alternativu dosadašnje korištenim konzervansima. Značajnijim istraživanjem RuBisCO-vih peptida u posljednje vrijeme, pojavljuju se dokazi o njihovoj antimikrobnoj aktivnosti. U jednoj studiji (Trovast i sur., 2007), visoke koncentracije pepsinom hidroliziranog izolata RuBisCO-ve male podjedinice i njene frakcije pokazale su djelomičnu bakteriostatičku aktivnost na uzorku dviju vrsta Gram-negativnih bakterija uz promjer zone inhibicije od oko 10 mm. Ova studija ukazuje na moguću zaključak da bi pročišćavanje dobivenih frakcija moglo dovesti do povećanja aktivnosti peptida i omogućiti njihovo baktericidno odnosno kompletno antimikrobno djelovanje. To je potvrdila druga studija (Kobbi i sur., 2015) u kojoj su pročišćene frakcije antimikrobnih peptida djelovale antimikrobno protiv Gram-negativne vrste *Escherichia coli* i Gram-pozitivnih vrsta *Micrococcus luteus*, *Listeria innocua* i *Bacillus subtilis*.

Osim nutritivne vrijednosti, proteini imaju i korisna tehno-funkcionalna svojstva koja omogućuju proizvodnju i stabilizaciju većine proizvoda. Funkcionalnost proteina u proizvodima može se ugrubo podijeliti na četiri vrste: pjenjenje, geliranje, emulgiranje i topljivost. Topljivost je najznačajnije svojstvo koje određuje ostala efikasnost ostalih svojstava. Trenutno korišteni proteinski dodaci većinom su životinjskog porijekla te se za sve veće potrebe ovih proteina trebaju osigurati održivije alternative. Biljni proteini predstavljaju jedan od novih izvora tehno-funkcionalnih proteina, a RuBisCO se prema dosadašnjim istraživanjima dokazao kao odlična alternativa. U jednom istraživanju (Martin i sur., 2019), RuBisCO izolat dobiven iz listova šećerne repe uspoređen je s izolatom proteina sirutke i izolatom proteina soje. Topljivost je iznosila preko 80 % u rasponima pH vrijednosti ispod 4 i iznad 6. Pri koncentraciji od 10 g/kg izolat RuBisCO-a formirao je visoko stabilnu pjenu, a pri

vrijednosti pH 4 formirao je stabilnije pjene u odnosu na proteine sirutke i sojin izolat (ovaj izolat se često koristi u kiselijim proizvodima). Emulzije dobivene korištenjem RuBisCO izolata odlikovale su se zadovoljavajuće malom veličinom kapljica ulja, dobrom stabilnošću i bijelom bojom te se može usporediti sa emulgirajućim svojstvima većine proteinskih izolata trenutno korištenih u proizvodnji hrane. Geliranje se pokazalo kao izvanredno tehno-funkcionalno svojstvo izolata RuBisCO-a zato što zahtjeva 50-66 % nižu koncentraciju dodanog izolata pri kojoj pokazuje isti efekt geliranja u odnosu na proteine sirutke i protein soje. Zbog navedenih karakteristika RuBisCO bi mogao pronaći svoju ulogu u proizvodnji npr. proizvoda od kave, sladoleda i deserata i na taj način ponuditi održiviju alternativu.

2.5. Održivi razvoj i ciljevi održivog razvoja

Održivi razvoj podrazumijeva racionalno iskorištavanje i upravljanje resursima i zadovoljenje potreba društva današnjice bez negativnog utjecaja na mogućnost kvalitetnog i sigurnog života budućih generacija. Sastoji se od sedamnaest velikih zacrtanih ciljeva koje bi uključene države i društvo trebali provesti do kraja 2030. godine kako bi se usporili ili zaustavili negativni trendovi kao što je npr. siromaštvo u svijetu. Ciljevi su uklopljeni u Program globalnog razvoja do 2030. godine (tzv. Agenda 2030) koji je usvojilo 150 svjetskih čelnika 25. rujna 2015. godine na sedamdesetoj obljetnici Ujedinjenih naroda održanoj u New Yorku (Anonymous 4, 2022). Ciljevi (slika 7.) i njihova pojašnjenja objavljeni su na web-stranici UN-ovog programa održivog razvoja (UN, 2015). Prvi se cilj odnosi na iskorjenjivanje siromaštva svugdje i u svim prisutnim oblicima. Siromaštvo ne karakterizira samo nedostatak prihoda već i glad, pothranjenost, ograničen pristup osnovnim uslugama i socijalna diskriminacija. Od 1990. godine pa dosad, postotak ljudi u siromaštvu smanjen je za pola no nedavna Covid-19 kriza prijeti obrtanju tog postignuća. Drugi cilj fokusira se na iskorjenjivanje gladi, postizanje sigurnosti hrane, poboljšanje prehrane i razvoj održivih poljoprivrednih metoda kojima bi povećala mogućnost adaptacije ekosustava na klimatske promjene i prirodne katastrofe poput suša i poplava. Treći cilj ukazuje na važnost osiguranja zdravog života i promoviranje blagostanja ljudi svih generacija kao bitne temelje održivog razvoja. Ovim ciljem želi se postići univerzalna dostupnost osnovnih, i pritom kvalitetnih, usluga zdravstvene zaštite te smanjenje broja oboljelih i smrtno stradalih kao posljedice zagađenja zraka, vode i tla. Četvrtim ciljem želi se osigurati kvalitetno obrazovanje. Kvalitetno i opće-dostupno obrazovanje jedan je od temelja socioekonomske mobilnosti pomoću kojeg bi mnogi ljudi

mogli naći put za izlaz iz siromaštva, proširiti vidike i tako spremnije sudjelovati u održivom razvoju svijeta. Do 2030. godine želi se osigurati kvalitetno i jeftino tehničko, stručno pa čak i fakultetsko obrazovanje za sve žene i muškarce. Tim putem želi se osigurati da što više ljudi stekne relevantne vještine koje će im pomoći pri budućem zapošljavanju i integriranju u održive sustave. Petim ciljem želi se postići rodna ravnopravnost i osigurati da žene svih dobi imaju jednak pristup obrazovanju, zdravstvenoj skrbi, dostojanstvenom radu kao što imaju muškarci te se želi postići njihova zastupljenost pri donošenju odluka u gospodarskim i političkim procesima. Šestim ciljem želi se osigurati univerzalni pristup čistoj vodi i higijenskim uvjetima. Sedmim ciljem želi se postići univerzalan pristup održivoj i suvremenoj energiji. Pristupačna i obnovljiva čista energija jedan je temelja održivog razvoja jer je energija prisutna u svim aspektima čovječanstva, a energetska učinkovitost, čistoća i obnovljivost imaju sposobnost mijenjati gospodarstvo, ljudske živote i na kraju krajeva – planet. Osmi cilj promovira održivi gospodarski rast i dostojanstven rad za sve. To znači da ljudi rade u pristojnim radnim uvjetima koji im omogućuju poboljšanje životnog standarda. Devetim ciljem potiču se izgradnja infrastrukture, održiva industrijalizacija i inovativnost. Ulaganje u prilagodljivu infrastrukturu ključno je za formiranje snažnih i učinkovitih zajednica i zemalja. Isto tako, održiva industrijalizacija potiče stvaranje ekološki prihvatljivog kapitala kojim se podiže životni standard. Inovacija je ključna u provođenju održive industrijalizacije jer pruža nova ekološki prihvatljiva rješenja kao što je npr. energetska učinkovitost i čistoća. Desetim ciljem želi se postići razrješenje nejednakosti unutar i između država smanjenjem nejednakosti u relativnih dohocima i pogodovanjem državama slabog prihoda na način da se s njima poveća razmjena robe. Jedanaestim ciljem žele se postići održivi, prilagodljivi i sigurni gradovi i naselja. Od 2007. godine pa do danas, više od polovica svjetske populacije živi u gradovima, a udio će samo nastaviti rasti. Gradovi su središte novih ideja, tehnologija i ekonomskog rasta. Također su odgovorni i za veliku emisiju ugljikovog dioksida i potrošnju resursa na globalnoj razini. Zato je od velike važnosti osigurati održive urbane zajednice koje se odlikuju visokom energetsom efikasnošću i upotrebom čiste energije te snažnom i prilagodljivom infrastrukturom. Dvanaestim ciljem žele se osigurati održivi i odgovorni oblici potrošnje i proizvodnje. Globalna ponuda i potražnja pokretačka su sila globalne ekonomije, no počivaju na iskorištavanju okoliša i resursa na način koji destruktivno utječe na planet. S druge strane, održiva potrošnja i proizvodnja temelje se na boljem i većem stvaranju s manje potrebnih resursa na način da se poveća efikasnost iskorištenja resursa putem npr. valorizacije nusproizvoda koji su se donedavno smatrali otpadom. Trinaesti cilj fokusira se na razvijanje

svijesti i predlaganje novih modela kako se suočiti s globalnim klimatskim promjenama. Globalne klimatske promjene ne predstavljaju problem samo za ekosustave već i za globalnu ekonomiju i živote svih ljudi. Pitanje klimatskih promjena tiče se svih zemalja svijeta jer emisije na jednom mjestu utječu na širu okolinu. Zato su od iznimne važnosti međunarodna suradnja i investicije kojima će se pomoći zemljama u razvoju da svoje gospodarstvo zakrenu u smjeru nižih razina emisije štetnih ugljikovih spojeva. Svjetski oceani iznimno su bitni čimbenik globalnih sustava koji čine Zemlju povoljnom za život. Upravo se četrnaestim ciljem žele očuvati oceani i ostale morske površine kako ne bi došlo do nepoželjnih promjena koje bi imale priliku negativno utjecati na cijeli svijet. Žele se uspostaviti sustavi održivog iskorištavanja morskih resursa i sustavi kojima bi se uvelike, a naposljetku i zaustavilo, zagađenje morskih površina. Petnaesti cilj ima sličan motiv, a odnosi se na očuvanje života i ekosustava na kopnu. Kopnene sustave većinom čine šume i zelene površine koje su, osim izvora bioraznolikosti i hrane, bitne za reguliranje klimatskih promjena. U sklopu ovog cilja žele se zaštititi šume, slatkovodni ekosustavi i suzbiti dezertifikacija uzrokovani štetnim ljudskim djelovanjem i klimatskim promjenama. Šesnaesti cilj posvećen je promicanju društava kojima su mir i pravda za sve stanovnike primarni ciljevi. Zahtjeva vladavinu prava i formiranje odgovornih, nekorumpiranih, transparentnih i učinkovitih institucija. UN je procijenio da korupcija, mito, krađa i izbjegavanje poreza koštaju zemlje u razvoju oko 1,26 bilijuna dolara godišnje. Pametnije preusmjeravanje i ulaganje tog novca, uvelike bi pomoglo u tranziciji društava tih zemalja prema održivijoj i pravednijoj budućnosti. Naposljetku, sedamnaesti cilj prepoznaje kako svi zahtijevani ciljevi održivog razvoja ne mogu biti postignuti bez čvrstog međunarodnog partnerstva i suradnje. Partnerstva bi trebala počivati na zajedničkoj viziji, načelima i vrijednostima, a koji ljude i planet stavljaju u središte te su potrebna kako na globalnoj tako i na lokalnoj razini.



Slika 7. Ciljevi održivog razvoja u sklopu Agende 2030 (Anonymous 5, 2022)

3. ZAKLJUČCI

1. U današnje vrijeme, nusproizvodi prehrambene i agronomske industrije pokazali su se kao obećavajući izvor sastojaka visoke dodane vrijednosti koji se mogu vratiti u lanac proizvodnje prehrambenih proizvoda kojima bi se na taj način povećale nutritivna vrijednost i funkcionalne karakteristike.

2. Listovi šećerne repe su se prema dosadašnjim istraživanjima pokazali kao dobar i održiv izvor funkcionalnih komponenata, a posebice proteina od kojih najveći udio otpada na RuBisCO.

3. RuBisCO se odlikuje korisnim tehno-funkcionalnim karakteristikama i zadovoljavajućim aminokiselinskim profilom, a samim time i dobrom nutritivnom vrijednošću. Ove činjenice bi u budućnosti mogle dovesti do razvoja raznih održivijih i ekološki prihvatljivijih novih proizvoda koji će pridonijeti rastu i raznolikosti tržišta koje je potrebno za ekološki sve osvješteniju populaciju

4. Zasad su istraživanja na RuBisCO-u većinom bila na razini laboratorija te su potrebna daljnja istraživanja i povećana osviještenost za moguće primjene ovog proteina kako bi se proces mogao dovesti na ekonomski isplativu i održivu industrijsku razinu

5. Pravilnom valorizacijom listova šećerne repe pridonosi se postizanju nekoliko ciljeva održivog razvoja čije je ostvarenje planirano do 2030. godine: pridonosi **prvom** cilju na način da osigurava novi izvor nutritivno vrijednog proteina koji bi mogao nuditi jedno od rješenja za problem pothranjenosti u svijetu, pridonosi **drugom** cilju na sličan način tako što pruža alternativni i održiviji izvor proteina koji bi mogao pomoći u smanjenju štetnog utjecaja mesne industrije i zadovoljenju sve veće potrebe za proteinima uslijed rastuće populacije, pridonosi **devetom** cilju jer pruža mogućnost razvoja novih proizvoda za nova tržišta te na taj način pozitivno utječe na održivost gospodarskog razvoja, pridonosi **dvanaestom** cilju jer pruža mogućnost bolje učinkovitosti u iskorištavanju resursa jer bi se dosadašnjim resursima valorizacijom listova šećerne repe proizvelo više korisnih proizvoda koji su naposljetku održivi i pozitivnog utjecaja na okoliš. Naposljetku, pridonosi i **trinaestom** cilju održivog razvoja jer pruža održiviju proizvodnju proteina koju karakterizira manja emisija štetnih ugljikovih

spojeva koji imaju jednu od ključnih uloga u ubrzavanju procesa globalnog zagrijavanja i samim time u formiranju nepogodnih klimatskih uvjeta.

4. POPIS LITERATURE

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

Anonymous 1 (2019)

<

https://en.wikipedia.org/wiki/Bradford_protein_assay#/media/File:Bradford_protein_assay.jpg> Pristupljeno 8.6.2022.

Anonymous 2 (datum nepoznat) <<https://www.sesvanderhave.com/>> Pristupljeno 12.6. 2022.

Anonymous 3 (2018) <<https://ourworldindata.org/>> Pristupljeno 13.6.2022.

Anonymous 4 (2016) <<https://odgovorno.hr/novi-ambiciozni-globalni-ciljevi-za-odrzivi-razvoj-un-2015/>> Pristupljeno 14.6.2022.

Anonymous 5 (2021) <<https://crosol.hr/eupresidency/hr/predstavljanje-izvjestaja-i-diskusija-na-temu-provedbe-ciljeva-odrzivog-razvoja-i-agende-2030-u-hrvatskoj/>> Pristupljeno 14.6.2022.

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

Heinemann B, Künzler P, Eubel H, Braun HP, Hildebrandt TM (2021) Estimating the number of protein molecules in a plant cell: protein and amino acid homeostasis during drought. *Plant phys*, **185**(2), 385-404. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa050>

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem*, **72** (1-2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Compton SJ, Jones CG (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analyt biochem*, **151(2)**, 369-374. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3)

Crowther J (2008) Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). U: Walker JM, Rapley R (ured.) *Molecular Biomethods Handbook*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-375-6_37, str. 657-682

Dhingra A, Portis Jr AR, Daniell H (2004) Enhanced translation of a chloroplast-expressed Rbc S gene restores small subunit levels and photosynthesis in nuclear Rbc S antisense plants. *PNAS*, **101(16)**, 6315-6320. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400981101>

El-Gengaihi SE, Hamed MA, Aboubaker DH, Mossa AT (2016) Flavonoids from sugar beet leaves as hepatoprotective agent. *Int J Pharm Pharm Sci*, **8**, 281-286.

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

Ellis RJ (1979) The most abundant protein in the world. *Trends biochem sci*, **4(11)**, 241-244. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(79\)90212-3](https://doi.org/10.1016/0968-0004(79)90212-3)

Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G (2009) Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Ann rev plnt bio*, **60**, 455-484. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.091948>

Gaweł E (2012) Chemical composition of lucerne leaf extract (EFL) and its applications as a phytobiotic in human nutrition. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. **11(3)**, 303-309.

Gómez-García R, Campos DA, Aguilar CN, Madureira AR, Pintado M (2021) Valorisation of food agro-industrial by-products: From the past to the present and perspectives. *J Environ*

Manage, **299**, 113571. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113571>

Haque E, Chand R (2008) Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. *Eur Food Res Technol*, **227**(1), 7-15. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0689-6>

Højland JG, Pedersen S (1994) Sugar beet, beetroot and fodder Beet (*Beta vulgaris* L. *subsp. vulgaris*): Dispersal, establishment and interactions with the environment. The National Forest and Nature Agency, Copenhagen, Denmark, 73p.

Karkehabadi S (2005) Structure-function studies of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: activation, thermostability, and CO₂/O₂ specificity (doktorski rad), Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala

Kobbi S, Balti R, Bougatef A, Le Flem G, Firdaous L, Bigan M i sur. (2015) Antibacterial activity of novel peptides isolated from protein hydrolysates of RuBisCO purified from green juice alfalfa. *J Func Foods*, **18**, 703-713. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.007>

Kobbi S, Bougatef A, Balti R, Mickael C, Fertin B, Chaabouni S i sur. (2017) Purification and recovery of RuBisCO protein from alfalfa green juice: antioxidative properties of generated protein hydrolysate. *Waste biomass valor*, **8**(2), 493-504. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9589-y>

Lilley R M, Wang X, Krausz E, Andrews TJ (2003) Complete spectra of the far-red chemiluminescence of the oxygenase reaction of Mn²⁺-activated ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase establish excited Mn²⁺ as the source. *J Biol Chem*, **278**(19), 16488-16493. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212402200>

Lorimer GH, Badger MR, Andrews TJ (1976) The activation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria, kinetics, a suggested mechanism, and physiological implications. *Biochem*, **15**(3), 529-536. <https://doi.org/10.1021/bi00648a012>

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

Miziorko HM, Sealy RC (1980) Characterization of the ribulosebisphosphate carboxylase-carbon dioxide-divalent cation-carboxypentitol bisphosphate complex. *Biochem*, **19**(6), 1167-1171. <https://doi.org/10.1021/bi00547a020>

Kawashima N, Wildman SG (1970) Fraction I protein. *Ann Rev Plant Physiol*, **21**(1), 325-358. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.21.060170.001545>

Ninfa, Ballou, Benore, Alexander J, David P, Marilee (2010) Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology, 2. izd., John Wiley & Sons, United States of America, str. 110, 113

Okutucu B, Dıncern A, Habib Ö, Zıhnioglu F (2007) Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. *J biochem biophys meth*, **70**(5), 709-711. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2007.05.009>

Reisner AH, Nemes P, Bucholtz C (1975) The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Analyt biochem*, **64**(2), 509-516. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(75\)90461-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(75)90461-3)

Sacała E, Demczuk A, Grzyś E, Prośba-Białczyk U, Szajsner H (2016) Effect of laser – and hydropriming of seeds on some physiological parameters in sugar beet. *J Elementol*, **21**(2), 527-538. <http://dx.doi.org/10.5601/jelem.2015.20.3.953>

Sedmak JJ, Grossberg, SE (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analyt biochem*, **79(1-2)**, 544-552. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90428-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90428-6)

Sesar V (2017) Određivanje koncentracije proteina-usporedba Bradford, Lowry i Buret metode (doktorska disertacija), Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. Department of Chemistry. Department of Analytical, Organic and Applied Chemistry). <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:949058>

Sevindik E (2017) Amino Acids Sequence Based in Silico Analysis of RuBisCO (Ribulose-1,5 Biphosphate Carboxylase Oxygenase) Proteins in Some *Carthamus L. ssp. Notu Scien Biolo*, **9(2)**, 204-208. <https://doi.org/10.15835/nsb9210053>

Sharkey, T. D. (1988) Estimating the rate of photorespiration in leaves. *Physiol Plant*, **73(1)**, 147-152. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1988.tb09205.x>

Shen CH (2019) Quantification and analysis of proteins. Diagnostic Molecular Biology; Shen CH, 1. izd., Academic Press: Cambridge, MA, USA, str. 187-214.

Smith BJ (1984) SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. U: Walker JM (ured.) Proteins, 1.izd., Humana Press, str. 41-55

Spreitzer RJ, Salvucci ME (2002) RUBISCO: Structure, Regulatory Interactions, and Possibilities for a Better Enzyme. *Ann Rev Plant Biol*, **53(1)**, 449–475. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135233>

Tabita FR, Hanson TE, Li H, Satagopan S, Singh J, Chan S (2007) Function, structure, and evolution of the RubisCO-like proteins and their RubisCO homologs. *Microbiol Molec Biolo Rev*, **71(4)**, 576-599. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-07>

Tabita F R (1999) Microbial ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: a different perspective. *Photosynth Res*, **60**(1), 1-28. <https://doi.org/10.1023/A:1006211417981>

Tenorio, AT (2017) Sugar beet leaves for functional ingredients (doktorska disertacija), Wageningen University and Research. <https://doi.org/10.18174/409816>

Trovaslet M, Kapel R, Ravallec-Plé R, Mouni F, Clarisse M, Faille C i sur. (2007) Secretagogue and bacteriostatic active fractions derived from a peptic hydro-lysate of alfalfa RuBisCO small purified subunit. *J Sci Food Agri*, **87**(3), 534-540. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2754>

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

UN (2015): The sustainable development agenda

<<https://www.un.org/sustainabledevelopment/sustainable-development-goals/>> Pristupljeno 14.6.2022.

Wilson CM (1979) Studies and critique of Amido Black 10B, Coomassie Blue R, and Fast Green FCF as stains for proteins after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analyt biochem*, **96**(2), 263-278. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90581-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90581-5)

Woodwell, G. M. (1978) The carbon dioxide question. *Sci Amer*, **238**(1), 34-43. <http://www.jstor.org/stable/24955612>

Yang S, Yunden J, Sonoda S, Doyama N, Lipkowski AW, Kawamura Y, Yoshikawa M (2001) Rubiscolin, a δ selective opioid peptide derived from plant Rubisco. *FEBS letters*, **509**(2), 213-217. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03042-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03042-3)

Yang Y, Marczak ED, Yokoo M, Usui H, Yoshikawa M (2003) Isolation and antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from spinach Rubisco. *J Agri Food Chem*, **51**(17), 4897-4902. <https://doi.org/10.1021/jf026186y>

Izjava o izvornosti

Ja Sven Kovačiček 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.

Sven Kovačiček

Vlastoručni potpis