

# Utjecaj ultrazvuka visoke snage na prinos sekundarnih biljnih metabolita i proteina iz lista šećerne repe

---

Hunić, Matea

Master's thesis / Diplomski 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:159:342673>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2022.

Matea Hunić

**UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKE  
SNAGE NA PRINOS  
SEKUNDARNIH BILJNIH  
METABOLITA I PROTEINA IZ  
LISTA ŠEĆERNE REPE**

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

Ovaj diplomski 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 graduate thesis 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

*Najprije se zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak na pomoći, savjetima i svom znanju prenesenom prilikom pisanja ovog diplomskog rada. Također, veliko hvala asistentici Josipi Dukić, mag. ing., na uloženom vremenu i pomoći, posebno tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.*

*Najveće zahvale upućujem bratu i dečku zbog nesebične potpore, kao i roditeljima koji su mi omogućili bezbrižno školovanje, ispunjeno bezuvjetnom podrškom i razumijevanjem.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za opće programe  
Laboratorij za održivi razvoj

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Prehrambeno inženjerstvo

### UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKE SNAGE NA PRINOS SEKUNDARNIH BILJNIH METABOLITA I PROTEINA IZ LISTA ŠEĆERNE REPE

*Matea Hunić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058210707*

**Sažetak:** Primjenom ultrazvuka visoke snage (UAE) i toplinskog tretmana, ekstrahirani su ukupni proteini i fenoli iz sušenih i svježih listova šećerne repe uz vodu kao otapalo. Spektrofotometrijskom metodom utvrđen je veći prinos UAE u odnosu na toplinsku ekstrakciju. Najveći udio ukupnih proteina iznosi  $147,9095 \pm 4,58 \text{ mg (g}_{s.tv.})^{-1}$ , a fenola  $17,8924 \pm 0,38 \text{ mg (g}_{s.tv.})^{-1}$ , uz amplitudu 100 % i vrijeme tretiranja 9 min. Za UAE izračunate su vrijednosti promjene temperature, ukupne promjene energije i gustoće snage. Statističkom obradom u programu STATGRAPHICS, ispitan je utjecaj amplitude i vremena tretiranja na ukupne proteine i fenole, pH te električnu vodljivost; a utvrđen je kao statistički značajan ( $p < 0,05$ ) za ukupne proteine. Uz optimalnu vrijednost 100 %, amplituda kod svježih listova pokazuje  $p < 0,05$  za ukupne fenole, električnu vodljivost i ukupnu promjenu energije; a kod sušenih listova za pH. Utjecaj vremena tretiranja toplinske ekstrakcije na izlazne parametre, ispitan analizom varijance, statistički je značajan kod ukupnih proteina i fenola sušenih listova te ukupnih proteina i električne vodljivosti svježih listova.

**Ključne riječi:** *ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, toplinska ekstrakcija, proteini, fenoli, list šećerne repe*

**Rad sadrži:** 70 stranica, 6 slika, 23 tablica, 69 literaturnih navoda, 17 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

**Pomoć pri izradi:** Josipa Dukić, mag. ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

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

**Datum obrane:** 6. srpnja 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of General Programmes  
Laboratory for sustainable development

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

### INFLUENCE OF HIGH POWER ULTRASOUND ON YIELD OF SECONDARY PLANT METABOLITES AND PROTEINS FROM SUGAR BEET LEAVES

*Matea Hunić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058210707*

**Abstract:** Using high power ultrasound (UAE) and heat treatment, total proteins and phenolics were extracted from dried and fresh sugar beet leaves with water as solvent. Spectrophotometric method showed a higher UAE yield compared to thermal extraction. The highest value for total proteins was  $147,9095 \pm 4,58 \text{ mg (gDM)}^{-1}$ , and for total phenolics  $17,8924 \pm 0,38 \text{ mg (gDM)}^{-1}$ , achieved with an amplitude of 100 % and treatment time 9 min. For UAE, values of temperature change, total energy change and power density were calculated. Statistical analysis in the STATGRAPHICS program examined the effect of amplitude and treatment time on total proteins and phenolics, pH and electrical conductivity; and was found to be statistically significant ( $p < 0,05$ ) for total proteins. With an optimal value of 100 %, the amplitude in fresh leaves shows  $p < 0,05$  for total phenols, electrical conductivity, and total energy change; and in the case of dried leaves for pH. The influence of thermal extraction treatment time on the output parameters, examined by analysis of variance, is statistically significant for total proteins and phenols of dried leaves and total proteins and electrical conductivity of fresh leaves.

**Keywords:** *ultrasonic assisted extraction, heat extraction, proteins, phenolics, sugar beet leaf*

**Thesis contains:** 70 pages, 6 figures, 23 tables, 69 references, 17 supplements

**Original in:** Croatian

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

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

**Technical support and assistance:** Josipa Dukić, MSc

**Reviewers:**

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

**Thesis defended:** July 6<sup>th</sup>, 2022



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. ODRŽIVI RAZVOJ .....	2
2.1.1. Potražnja i dostupnost proteina.....	3
2.2. LIST ŠEĆERNE REPE.....	5
2.2.1. List šećerne repe kao izvor proteina .....	6
2.2.1.1. <i>Potencijalna primjena biljnih proteina i njihovih ekstrakata</i> .....	7
2.2.2. List šećerne repe kao izvor sekundarnih biljnih metabolita .....	9
2.2.2.1. <i>Potencijalna primjena fenola i njihovih ekstrakata</i> .....	10
2.3. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM .....	11
2.3.1. Koncept zelene ekstrakcije .....	11
2.3.2. Svojstva ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.....	12
2.3.3. Izvedbe uređaja.....	13
2.3.4. Ultrazvučna ekstrakcija proteina i sekundarnih biljnih metabolita .....	14
2.4. ANALITIČKE METODE ANALIZE UKUPNIH PROTEINA I FENOLA .....	15
2.4.1. Kvantitativno određivanje udjela ukupnih proteina .....	15
2.4.2. Kvantitativno određivanje udjela ukupnih fenola .....	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>17</b>
3.1. MATERIJALI .....	17
3.1.1. List šećerne repe .....	17
3.1.1.1. <i>Označavanje uzoraka</i> .....	17
3.1.2. Kemikalije i standardi.....	18
3.1.3. Aparatura i pribor .....	19
3.1.3.1 <i>Aparatura</i> .....	19
3.1.3.2. <i>Pribor</i> .....	20
3.2. METODE .....	21
3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visoke snage .....	21
3.2.1.1. <i>Postupak provedbe ekstrakcije potpomognute ultrazvukom</i> .....	21
3.2.2. Toplinska ekstrakcija.....	23
3.2.2.1. <i>Postupak provedbe konvencionalne - toplinske ekstrakcije</i> .....	24

3.2.3. Određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom po Lowry-ju .....	24
3.2.3.1. Priprema uzorka za određivanje koncentracije ukupnih proteina .....	24
3.2.3.2. Postupak određivanja koncentracije ukupnih proteina .....	25
3.2.3.3. Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije ukupnih proteina ....	26
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ukupnih fenola.....	27
3.2.4.1. Postupak određivanja koncentracije ukupnih fenola.....	27
3.2.4.2. Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije ukupnih fenola .....	27
3.2.5. Određivanje suhe tvari sušenjem do konstantne mase .....	28
3.2.5.1. Postupak određivanja suhe tvari sušenjem do konstantne mase .....	29
3.2.6. Obrada podataka .....	29
3.2.6.1. Statistička obrada podataka dobivenih nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visoke snage .....	29
3.2.6.2. Statistička obrada podataka dobivenih nakon toplinske ekstrakcije .....	30
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>31</b>
4.1. REZULTATI FIZIKALNIH PARAMETARA DOBIVENIH TIJEKOM EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE ULTRAZVUKOM.....	32
4.2. REZULTATI PARAMETARA MJERENIH NAKON PROVEDENIH EKSTRAKCIJA .....	36
4.2.1. Rezultati ispitivanih svojstava nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.....	36
4.2.2. Rezultati ispitivanih svojstava nakon toplinske ekstrakcije .....	41
4.2.3. Usporedba rezultata ispitivanih svojstava dobivenih nakon provedenih ekstrakcija ..	42
4.3. REZULTATI ODREĐIVANJA SUHE TVARI SUŠENJEM DO KONSTANTNE MASE.....	45
4.4. REZULTATI STATISTIČKE OBRADE PODATAKA EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE ULTRAZVUKOM .....	45
4.4.1. Rezultati statističke obrade i optimiranja parametara za uzorak LUDI.....	45
4.4.1.1. Statistička analiza eksperimenta – ukupni proteini .....	45
4.4.1.2. Statistička analiza eksperimenta – ukupni fenolni spojevi .....	47
4.4.1.3. Statistička analiza eksperimenta – pH vrijednost.....	47
4.4.1.4. Statistička analiza eksperimenta – električna vodljivost .....	48
4.4.1.5. Statistička analiza eksperimenta – ukupna promjena energije.....	48
4.4.2. Rezultati statističke obrade i optimiranja parametara za uzorak LUDW .....	49
4.4.2.1. Statistička analiza eksperimenta – ukupni proteini .....	49
4.4.2.2. Statistička analiza eksperimenta – ukupni fenolni spojevi .....	50

4.4.2.3. Statistička analiza eksperimenta – pH vrijednost .....	50
4.4.2.4. Statistička analiza eksperimenta – električna vodljivost .....	51
4.4.2.5. Statistička analiza eksperimenta – ukupna promjena energije.....	51
4.4.3. Rezultati statističke obrade i optimiranja parametara za uzorak LUWI.....	52
4.4.3.1. Statistička analiza eksperimenta – ukupni proteini .....	52
4.4.3.2. Statistička analiza eksperimenta – ukupni fenolni spojevi .....	52
4.4.3.3. Statistička analiza eksperimenta – pH vrijednost.....	53
4.4.3.4. Statistička analiza eksperimenta – električna vodljivost .....	53
4.4.3.5. Statistička analiza eksperimenta – ukupna promjena energije.....	54
4.4.4. Rezultati statističke obrade i optimiranja parametara za uzorak LUWW .....	54
4.4.4.1. Statistička analiza eksperimenta – ukupni proteini .....	54
4.4.4.2. Statistička analiza eksperimenta – ukupni fenolni spojevi .....	55
4.4.4.3. Statistička analiza eksperimenta – pH vrijednost.....	55
4.4.4.4. Statistička analiza eksperimenta – električna vodljivost .....	56
4.4.4.5. Statistička analiza eksperimenta – ukupna promjena energije.....	57
4.5. REZULTATI STATISTIČKE OBRADE PODATAKA TOPLINSKE EKSTRAKCIJE. 58	
4.5.1. Rezultati analize varijance (ANOVA) za uzorak LDO .....	58
4.5.2. Rezultati analize varijance (ANOVA) za uzorak LWO .....	60
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>62</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>63</b>

# 1. UVOD

U posljednjih nekoliko godina, promjene okolišnih uvjeta i smanjenje dostupnosti prirodnih resursa rezultiraju većim pritiskom na gospodarstvo i industrijsku proizvodnju hrane. Iz tog razloga, koncept kružnog gospodarstva, kao dio održivog razvoja, predstavlja način prevladavanja postojećeg modela proizvodnje koji bi uspješno povećao iskorištenje prisutnih resursa i time smanjio industrijski otpad. U skladu s tim, javlja se sve veći interes za pretvorbu nusproizvoda prerade u komercijalno vrijedne proizvode korištenjem „zelenih“ metoda, pri čemu se ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom ističe kao tehnika primjerena za izdvajanje visokovrijednih spojeva iz takvih izvora. Također, s ekološkog i ekonomskog stajališta, tehnike „zelene ekstrakcije“ predstavljaju jedan od najbitnijih koraka u dobivanju bioaktivnih spojeva iz sporednih tokova prerade šećernih sirovina (Gharib-Bibalan, 2018).

Zbog adekvatnog nutritivnog sastava, potaknuta su istraživanja kojima bi se ostvarila izolacija i upotreba visokovrijednih spojeva listova šećerne repe, u ljudskoj prehrani i prehrambenoj industriji (Kiskini i sur., 2016; Tamayo Tenorio i sur., 2016). Dosadašnja istraživanja, usmjerena su uglavnom na ekstrakciju i pročišćavanje proteina lista u svrhu dobivanja topive i bezbojne proteinske frakcije RuBisCO enzima (Udenigwe i sur., 2017). Takav pristup zanemaruje kompletan sadržaj proteina u listovima, koji posljedično ostaje neiskorišten. Osim proteina, listovi sadrže brojne visokovrijedne spojeve (npr. dijetalna vlakna, minerali i sekundarni metaboliti) koji potencijalno proširuju mogućnosti upotrebe listova i povećavaju njihovo iskorištenje.

Opći cilj ovog diplomskog rada bio je steći znanja o mogućoj primjeni listova šećerne repe, obzirom na njihovu dostupnost kao nusproizvoda prehrambene industrije. Eksperimentalni dio rada imao je tri cilja koji se odnose na (i) usporedbu ekstrakcije potpomognute ultrazvukom s toplinskom ekstrakcijom obzirom na različite uvjete tretmana, (ii) spektrofotometrijsko određivanje i usporedba koncentracije ukupnih proteina i fenola u dobivenim ekstraktima te (iii) provedbu eksperimentalnog dizajna uz optimizaciju uvjeta ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, kao i statističku obradu izlaznih podataka za bolje razumijevanje i pronalaženje statistički značajnih parametara i kritičnih točaka u procesu. Budući da ekstrakcija proteina i sekundarnih metabolita iz listova može biti izazovna zbog visokog udjela vode i enzimske aktivnosti, u eksperimentu su korišteni sušeni i svježi listovi šećerne repe, kako bi se dobiveni udjeli ukupnih proteina i fenola mogli usporediti i obzirom na sadržaj vlage u uzorcima lista.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. ODRŽIVI RAZVOJ

Tijekom proteklih pedeset godina, povećan ljudski utjecaj na Zemlju i njezine resurse, kroz gospodarski, znanstveni i tehnološki razvoj, rezultirao je značajnim klimatskim promjenama. Jedno od rješenja nastalih problema je težnja ka održivom razvoju. Održivi razvoj je prvi put opisan kao „razvoj koji zadovoljava potrebe sadašnjosti, bez ugrožavanja mogućnosti budućih generacija za zadovoljavanjem vlastitih potreba“ (Purvis i sur., 2019). Održivi razvoj ima tri glavna cilja: ekonomsku učinkovitost, socijalnu pravednost i održivost okoliša, a istovremeno zahtjeva značajne promjene u načinu razmišljanja i iskorištavanja resursa. Jedan od primjera realizacije ciljeva održivog razvoja je „Agenda 2030. za održivi razvoj“, koju su usvojile sve države članice Ujedinjenih naroda 2015. godine, uključujući i Republiku Hrvatsku. Plan uključuje 17 ciljeva koji obuhvaćaju područja klimatskih promjena, gospodarstva, društva, kvalitete života i političkih pitanja, te je iste potrebno realizirati do 2030. godine. Strategije koje uključuju održivi razvoj u sektoru prehrambene industrije su „Zeleni plan“ i „Od polja do stola“, koje potiču smanjenje emisije stakleničkih plinova, korištenje obnovljivih izvora energije i različitih ekoloških metoda obrade (EC, 2019). Tijekom posljednjih nekoliko godina, u vidu održivog razvoja, pojavljuje se i pojam kružne ekonomije. Koncept kružne ekonomije predstavlja mogućnost unaprjeđenja postojećeg modela proizvodnje i potrošnje, a temelji se na kontinuiranom rastu i većoj potrošnji dostupnih resursa. Takav zatvoreni pristup ka proizvodnom procesu unutar prehrambenog lanca, mogao bi povećati iskorištenje resursa i smanjiti industrijski otpad, odnosno nusproizvode.

Pojam „otpad od hrane“ je prema Organizaciji za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (engl. *Food and Agriculture Organization, FAO*) „cjelovit jestivi materijal namijenjen ljudskoj prehrani, koji nastaje u bilo kojem dijelu lanca opskrbe hranom, a koji se umjesto toga odbacuje, gubi, razgrađuje ili konzumira od strane štetočina“ (Boland i sur., 2013). Duž lanca opskrbe hranom, gubici uključuju otpad od hrane biljnog i životinjskog porijekla. Otpadni ostaci biljaka obuhvaćaju otpatke nastale obrezivanjem i ljuštenjem, stabljike, sjemenke, korijenje i ljuske iz različitih industrija kao što su industrija šećera, uljna industrija i industrija voćnih sokova (Falcone i Imbert, 2017). Kao dio istraživanja provedenog u Ujedinjenom Kraljevstvu, predstavljen je postotni omjer količine otpada nastalog od hrane tijekom industrijske proizvodnje pri čemu

industrija prerade voća i povrća stvara 14,8 % otpadnih sirovina, u usporedbi s industrijom ribe i morskih plodova gdje nastaje samo 0,4 % otpada (Tonini i sur., 2018).

Svake godine, oko 1,3 milijarde tona jestivog materijala biva neiskorišteno, što čini jednu trećinu ukupne svjetske proizvodnje hrane (FAO, 2011). Iskorištavanje otpadnih ostataka i nusproizvoda koji nastaju preradom hrane, potrebno je provoditi u svrhu poboljšanja gospodarske učinkovitost i osiguranja ekološke održivosti. Spojevi dobiveni iz otpadnih sirovina mogu imati potencijalnu primjenu u različitim sektorima prehrambene industrije i biotehnologije. Istraživanja su pokazala da se u sjemenkama, kori, listu i stabljici biljaka, nalaze znatne količine bioaktivnih spojeva (Rudra i sur., 2015) koji se mogu potencijalno primjenjivati u prehrambenoj industriji kao sastojci hrane ili kao dodaci prehrani. Listovi mnogih biljaka prepoznati su kao potencijalni izvor proteina i ostalih bioaktivnih spojeva, za primjenu u hrani na temelju njihovog nutritivnog sastava i velike dostupnosti u obliku poljoprivrednog otpada. Naime, kod većine industrijski važnih usjeva, beru se i prerađuju samo određeni dijelovi biljaka (npr. korijen, cvjetovi, plodovi), dok lišće ostaje neiskorišteno. Korištenje biljnih nusproizvoda za proizvodnju visokovrijednih spojeva predstavlja zanimljivo rješenje s ekološkog gledišta, ali i izvrsnu mogućnost proizvodnje funkcionalnih prehrambenih proizvoda visoke nutritivne vrijednosti, posebice u vidu održivih izvora proteina kako bi se zadovoljila rastuća potražnja i zdravstveni učinak na organizam.

#### 2.1.1. Potražnja i dostupnost proteina

U današnje vrijeme, potaknuti rastućom svjetskom populacijom te socioekonomskim promjenama, obrasci prehrane modernog društva mijenjaju se na globalnoj razini. Promjene u načinu prehrane povezane su sa regulacijom tjelesne težine (Rosenfeld i Burrow, 2017), osviještenosti da izbor namirnica utječe na zdravlje pojedinca, te etičkim i ekološkim posljedicama koje se povezuju s uzgojem stoke te proizvodnjom mesa i proizvoda od mesa (Schosler i sur., 2012). Iz navedenih razloga, hrana bogata proteinima iz biljnih izvora sve više zamjenjuje meso, a suvremene alternative hrani s uravnoteženim sadržajem nutrijenata dobivaju više pozornosti od strane potrošača (Kumar i sur., 2017). Proteini su među ključnim nutrijentima odgovornim za zdravlje organizma i predstavljaju vrlo važnu komponentu ljudske prehrane – neophodni su za različite fiziološke procese kao što su održavanje mišićne mase, imunološki odgovor, staničnu signalizaciju i popravak oštećenih stanica (Wen i sur., 2019). U strukturi hrane, proteini imaju važnu ulogu zbog svoje funkcionalnosti, a ona uključuje topljivost, emulgiranje, pjenjenje i

želiranje – svojstva neophodna za postizanje jedinstvenih karakteristika u prehrambenim proizvodima. Posljedično, gubitak strukture proteina utječe na funkcionalnost i nutritivnu vrijednost namirnice.

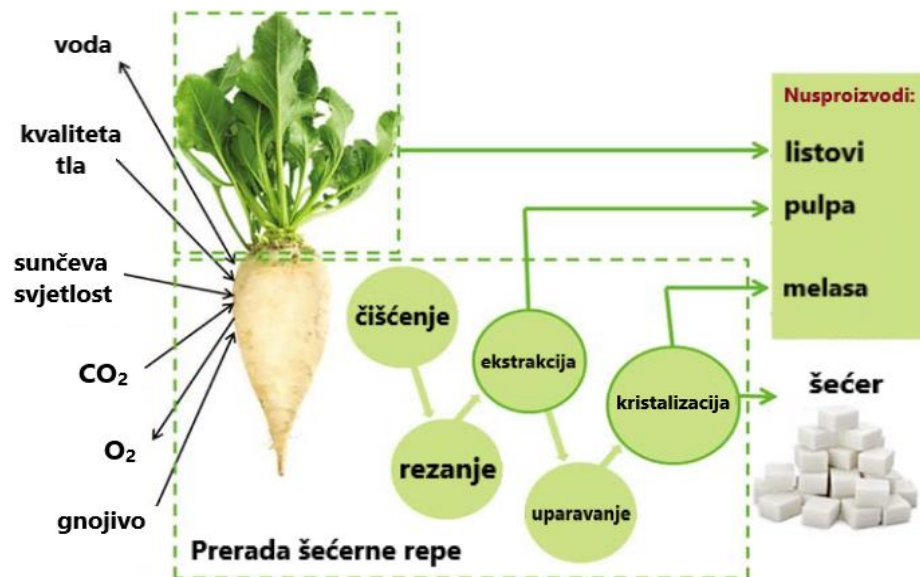
Henchion i sur. u istraživanju iz 2017. godine objavljuju da je potražnja proteina za tadašnje 7,3 milijarde svjetskog stanovništva iznosila oko 202 milijuna tona globalno (Henchion i sur., 2017). Obzirom na očekivani rast svjetske populacije na oko 8,5 milijardi do 2030. godine te 9,7 milijardi do 2050. godine (UN, 2019) i potencijalno sve veću potražnju za nutritivno bogatom hranom, pretpostavlja se pojava velikog opterećenja na budući sustav proizvodnje hrane. Proteini mesa predstavljaju izvrstan izvor esencijalnih aminokiselina te imaju visoko iskorištenje i probavljivost. Iz perspektive utjecaja na okoliš, masovni uzgoj životinja za proizvodnju hrane zahtijeva velike površine za uzgoj stočne hrane i opterećuje okoliš otpadnim tokovima, emisijom stakleničkih plinova i gubitkom biološke raznolikosti na kopnu. Uz to, sve veća potražnja za poljoprivrednim proizvodima i ograničena dostupnost obradivog tla, čini povećan uzgoj životinja neodrživim. Nastavno, djelomična zamjena životinjskih proteina biljnim izvorima u postojećim proizvodima i razvoj novih proizvoda na bazi biljnih proteina, predstavlja jednu od glavnih strategija iskorištenja dostupnih proteina i opskrbe esencijalnim makro nutrijentima, budući da su proteini iz biljnih izvora ekonomski isplativiji i održiviji u usporedbi s životinjskim (McClements i Grossmann, 2021).

Iz perspektive očuvanja okoliša i općeg zdravlja rastuće populacije, posljednjih su godina provedena istraživanja o alternativnim, klimatski prihvatljivijim izvorima proteina uz potporu različitih organizacija, uključujući Europsku komisiju (engl. *European Commission, EC*). Primjeri novih izvora proteina uključuju insekte, alge, meso uzgojeno *in vitro* i različite biljne izvore proteina – žitarice, orašasti plodovi, uljarice, mahunarke i zeleni listovi (Tanambell i sur., 2022). Među izvorima biljnih proteina, mahunarke su vjerojatno najvažnija skupina. Slijede proteini lista, koji potencijalno mogu biti glavni izvor proteina za primjenu u hrani. U tu svrhu razmatraju se listovi određenih usjeva, ovisno o njihovom sadržaju proteina, regionalnoj dostupnosti i općoj upotrebi (npr. lucerna, špinat, trava, moringa, duhan). Ostale izvore čine listovi dobiveni u velikim količinama kao nusproizvodi nekih usjeva (npr. manioka, ječam, brokula, **šećerna repa**). Izdvajanje proteina iz sporednih tokova (nusproizvoda) prerade, predstavlja veliki pomak u smanjenju nepovoljnih utjecaja prehrambene industrije na okoliš, ali i potencijalnu ekonomsku korist, s obzirom na valorizaciju proteinske frakcije dobivene iz takvog izvora.

## 2.2. LIST ŠEĆERNE REPE

Šećerna repa (*Beta vulgaris* L.), pripadnica *Chenopodiaceae*, smatra se drugom najvažnijom šećernom kulturom u svijetu nakon šećerne trske (*Saccharum officinarum* L.) i jednom od najbitnijih biljaka u prehrambenoj industriji s obzirom na čestu primjenu u prehrani čovjeka. Budući da uspijeva u područjima umjerene klime, omogućena je njena velika rasprostranjenost na naseljenim područjima – srednja i južna Europa, SAD i dr. (Stevanato i sur., 2019), pri čemu Europa čini 60 % svjetske proizvodnje.

Nakon berbe i prerade u industriji šećera, šećerna repa za sobom ostavlja niz nusproizvoda koji se mogu koristiti u mnoge svrhe (slika 1) – prerada korijena rezultira nastankom dva vrijedna proizvoda (pulpa i melasa šećerne repe) koji se odvojeno ili kombinirano mogu sušiti i obraditi na razne načine u svrhu proizvodnje visokokvalitetne stočne hrane (Berlowska i sur., 2018). Istovremeno, melasa šećerne repe može služiti i kao sirovina za fermentaciju u svrhu dobivanja raznih proizvoda dodane vrijednosti (Stevanato i sur., 2019).



**Slika 1.** Prerada šećerne repe i njeni nusproizvodi (prema Berlowska i sur., 2018)

Jedan od glavnih nusproizvoda šećerne repe čine glatki, tamnozeleni listovi, odvojeni od korijena prilikom berbe, koji se uglavnom koriste kao hrana za stoku ili se ostavljaju na poljima. Oni čine 20-34 % biljke, a težinom su uglavnom jednaki korijenu; ovisno o sorti, vremenu berbe i sezoni rasta (Berlowska i sur., 2018). Na temelju iznimnog nutritivnog sastava i dostupnosti u obliku poljoprivrednog otpada, potaknuto je pronalaženje primjene za visokovrijedne sastojke



listova, kroz ekstrakciju proteina i sekundarnih biljnih metabolita za upotrebu u ljudskoj prehrani i prehrambenoj industriji (Tamayo Tenorio i sur., 2016).

### 2.2.1. List šećerne repe kao izvor proteina

Promatranjem proteinskog sastava listova šećerne repe, utvrđen je prilično nizak udio (3-5 %), dok je s obzirom na suhu tvar sadržaj proteina visok, a iznosi 19,4-22,8 % (Tamayo Tenorio i sur., 2017; Lammens i sur., 2012) i čini listove šećerne repe obećavajućim izvorom proteina za korištenje u ljudskoj prehrani i hrani za životinje. Varijacije u konačnom prinosu proteina uglavnom su posljedica dostupnosti dušika u tlu (Kiskini i sur., 2016). Nastavno na dane vrijednosti, sadržaj proteina u listovima šećerne repe može se procijeniti na 40-60 g m<sup>-2</sup>, što je usporedivo s proizvodnjom proteina soje (45-60 g m<sup>-2</sup>) i žitarica (≈ 57 g m<sup>-2</sup>) (van Krimpen i sur., 2013). Nadalje, listovi šećerne repe imaju uravnotežen sastav aminokiselina – prisutnost esencijalnih aminokiselina kao što su leucin, valin, fenilalanin, lizin, treonin, izoleucin i metionin, dodatno pridonosi prehrambenoj vrijednosti i kvaliteti lista šećerne repe (Kiskini i sur., 2016).

U biljnim stanicama, većina topivih i netopivih proteina nalazi se u kloroplastima (80 %), gdje kroz reakcije fotosinteze sudjeluju u pretvorbi svjetlosne energije u kemijsku (Heinemann i sur., 2021). Netopljivi proteini uglavnom čine membranske proteine tilakoidnih membrana, gdje tvore složene fotosintetske sustave zajedno s pigmentima i kofaktorima (lipidi, karotenoidi i klorofil) ili se nalaze vezani za polisaharide (Martin i sur., 2014). Takvi membranski proteini proizvode energiju putem transportnog lanca za prijenos elektrona, pri čemu stvorena energija omogućuje fiksaciju ugljikovog dioksida (CO<sub>2</sub>) – kataliziranu enzimom topive frakcije zvanim RuBisCO (ribuloza 1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza).

U optimalnim uvjetima, RuBisCO čini gotovo 50 % topive frakcije proteina u listu šećerne repe, iako taj postotak varira ovisno o vrsti i uvjetima uzgoja (intenzitet svjetlosti i dostupnost dušika u tlu). Njegova prisutnost u listovima brojnih biljaka, čini ga najzastupljenijim proteinom na svijetu (Martin i sur., 2014). Pokazalo se da RuBisCO ima značajnu biološku vrijednost zbog svog sadržaja esencijalnih aminokiselina – bogat je triptofanom, leucinom, tirozinom i fenilalaninom (Edelman i Colt, 2016); a njegov sastav usporediv je sa sastavom proteina soje, mesa, ribe i jaja, što ga čini izvrsnim izvorom nutrijenata i jedinstvenim među biljnim proteinima. Također, RuBisCO posjeduje poželjna funkcionalna svojstva kao što su želiranje, pjenjenje i

emulgiranje što bi proizvođačima hrane omogućilo uspješnu ugradnju ovog proteina u brojne prehrambene sustave (Kaur i sur., 2021). Unatoč visokoj prisutnosti u prirodi i istaknutoj funkcionalnosti, RuBisCO ostaje nedovoljno iskorišten kao protein u industrijski proizvedenoj hrani, uglavnom kao posljedica tehnoloških izazova povezanih s njegovom ekstrakcijom iz biljaka ili njegovog niskog prinosa s obzirom na masu lista, budući da 85-90 % lista čini voda (Udenigwe i sur., 2017). Uz to, procesi ekstrakcije u svrhu dobivanja proteinskih izolata uvelike utječu na topljivost, stupanj denaturacije i sastav proizvoda, što posljedično mijenja i funkcionalna svojstva koja su relevantna za njihovu primjenu u hrani (Hayati Zeidanloo i sur., 2019).

#### *2.2.1.1. Potencijalna primjena biljnih proteina i njihovih ekstrakata*

Biljni proteini smatraju se funkcionalnim sastojcima u raznim formulacijama prehrambenih proizvoda gdje imaju različite uloge – sredstva za zgušnjavanje i želiranje, stabilizatori emulzija i pjene, vezivna sredstva za masnoću i vodu. Brojni koncentracije biljnih proteina komercijalno su dostupni, a koriste se u prehrambenoj industriji kao zamjena za životinjske proteine, u proizvodima biljnog podrijetla, umacima ili visokoproteinskim napitcima (Nieuwland i sur., 2021). Također, određeni proteini imaju i biološku vrijednost u vidu antioksidativnih i antimikrobnih svojstava (Nasrabadi i sur., 2021). Izolirani i pročišćeni topljivi proteini lista, uglavnom RuBisCO, već se razmatraju kao funkcionalni sastojci u proizvodnji hrane – pokazalo se da proteinski izolati koji sadrže RuBisCO, iz različitih biljnih izvora (duhan, lucerna, soja i listovi šećerne repe), posjeduju funkcionalna svojstva slična komercijalno dostupnim proteinskim izolatima (Martin i sur., 2014). koja im omogućuju uspješnu ugradnju u niz različitih prehrambenih proizvoda (razni deserti, kompozitni mesni proizvodi, sladoledi, pića i sl.). RuBisCO izolate karakterizira dobro svojstvo formiranja pjene u usporedbi s drugim komercijalno dostupnim proteinima (izolati proteina soje i sirutke), stoga se tako dobivena pjena može koristiti kao alternativa za pjene na mliječnoj bazi u proizvodima kao što su kava, sladoled i razni deserti (Udenigwe i sur., 2017). Također, dobro svojstvo želiranja omogućuje potencijalnu primjenu RuBisCO-a kao sredstva za želiranje u desertima namijenjenim za vegane.

Proteini lista mogu se koristiti za proizvodnju bioaktivnih peptida. Osim uporabe kao nutritivno bogatog izvora esencijalnih aminokiselina u prehrambenim proizvodima, istražena je i primjena RuBisCO-a kao održivog izvora bioaktivnih peptida. Peptidi izolirani iz RuBisCO-a pokazuju korisne učinke u promicanju zdravlja *in vitro* i *in vivo*, a potencijalno imaju i različite

biološke uloge u prevenciji i liječenju kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, imunoloških te neurodegenerativnih bolesti (Udenigwe i sur., 2017). Unošenje bioaktivnih biljnih peptida hranom predstavlja alternativu sintetskim lijekovima, a njihova proizvodnja iz nusproizvoda prehrambene industrije pridodaje im na važnosti s obzirom da se radi o jeftinoj i uglavnom neiskorištenoj sirovini.

Proteini iz biljnih izvora čine dobru alternativu sintetičkim polimerima u proizvodnji ambalažnih materijala s obzirom na njihovu održivost, biorazgradivost, obnovljivost te odgovarajuća mehanička, tehnološka i funkcionalna svojstva (Zhang i sur., 2018). Biorazgradiva ambalaža izrađena od biljnih proteina ima veliki utjecaj na poboljšanje kvalitete i sigurnosti hrane, ali i na smanjenje onečišćenja okoliša. Korištenje proteina, ekstrahiranih iz otpadnih nusproizvoda, za proizvodnju ambalaže i jestivih filmova potpomaže gospodarenju otpadom i daje dodatnu vrijednost takvim sirovinama. U proizvodnji jestivih filmova provedena su značajna istraživanja o svojstvima nekoliko globularnih proteina, uključujući pšenični gluten, kukuruzni zein i proteine soje (Garrido i sur., 2018). Iako nema konkretnih izvora koji opisuju korištenje proteina lista u svrhu proizvodnje ambalažnog materijala i jestivih filmova, biljni proteini općenito pokazuju dobru sposobnost stvaranja filmova te imaju dobra mehanička svojstva i barijerna svojstva za plinove. Korištenje proteina u jestivoj ambalaži ima povoljan utjecaj na poboljšanje stabilnosti i produljenje roka trajanja proizvoda, smanjenje ambalažnog otpada, a može služiti i za ugradnju bioaktivnih spojeva uz posljedično obogaćivanje nutritivnog sastava namirnice (Katiyar i Ghosh, 2021).

Dodatni potencijal u ekstraktima lista predstavljaju i proteini koji se uglavnom odbacuju tijekom izolacije RuBisCO-a, a radi se o netopivoj proteinskoj frakciji. Trenutno nema konkretnih izvora o upotrebi proteina iz sporednih tokova ekstrakcije i izolacije RuBisCO-a u prehrambenoj industriji. Međutim, usmjeravanjem ekstrakcije u svrhu dobivanja ukupnih proteina te pronalaskom njihove primjene, raste iskorištenje listova šećerne repe i sličnih nusproizvoda. U tom slučaju, postoji i mogućnost primjene sekundarnih biljnih metabolita koji se zajedno s proteinima nalaze u dobivenim ekstraktima. Dodatno, prisutni kompleksi (npr. protein-lipid, protein-ugljikohidrat) imaju određena funkcionalna svojstva koja je potrebno istražiti i karakterizirati za njihovo potencijalno korištenje u hrani. Na primjer, tilakoidne membrane (kompleks membranskih proteina i lipida) imaju dobra emulgirajuća svojstva i sporu probavljivost, a takve karakteristike omogućuju njihovu potencijalnu primjenu u mikrokapsuliranju (Rayner i

sur., 2011). Mikrokapsuliranje ima široku upotrebu u prehrambenoj industriji, a obuhvaća inkorporiranje različitih sastojaka hrane, enzima, antioksidansa, probiotika, vitamina, minerala i tvari arome u mikrokapsule. Kapsulirani materijal se na taj način štiti od nepoželjnih vanjskih uvjeta (voda, temperatura, pH) koji utječu na njihovu stabilnost i održivost. Općenito, biljni proteini imaju svojstva potrebna za tvorbu membrana mikrokapsula, a njihovo korištenje se s vremenom sve više istražuje i potencira (Karaca i sur., 2015).

### 2.2.2. List šećerne repe kao izvor sekundarnih biljnih metabolita

S obzirom na ukupan kemijski sastav, list šećerne repe sadrži nutrijente neophodne za funkcioniranje biljnih stanica, pri čemu određeni spojevi mogu povoljno utjecati i na ljudski organizam. Listovi šećerne repe sadrže minerale (ističu se kalij, magnezij i natrij), vitamin A te sekundarne metabolite (fitokemikalije – klorofil, flavonoidi, fenolne kiseline i dr.) (Gaweł, 2012) s antioksidacijskom aktivnosti kao obrambenim odgovorom protiv degradacije tkiva uzrokovane visokoreaktivnim kemijskim vrstama (slobodnim radikalima).

Sekundarni biljni metaboliti, proizvedeni u biljnim stanicama, obuhvaćaju raznolike molekule koje nastaju modifikacijama produkata primarnog metabolizma biljke. U većim koncentracijama, pokazuju antifungalna i antivirusna svojstva te štite biljku od biljojeda i raznih štetnika, djelujući negativno na njihove stanične i metaboličke procese. Također, apsorbiraju sunčeve ultraljubičaste (engl. *ultraviolet*, *UV*) zrake čime sprječavaju ozbiljna oštećenja listova od utjecaja svjetlosti (Hussein i El-Anssary, 2019). Sekundarni biljni metaboliti klasificiraju se prema kemijskoj strukturi u sljedeće kategorije: (i) fenoli, (ii) alkaloidi, (iii) saponini, (iv) terpeni, (v) lipidi i (vi) ugljikohidrati (Hussein i El-Anssary, 2019); od kojih fenoli čine najveću skupinu sa više od 8000 različitih vrsta spojeva.

Zajednička karakteristika svih vrsta fenola je prisutnost jedne ili više fenolnih (aromatskih) skupina, dok se prema složenosti dijele na flavonoide (flavoni, flavonoli, flavan-3-oli, izoflavoni, flavanoni, antocijanidini i dr.) i ne-flavonoide (fenolne kiseline i dr.) (Del Rio i sur., 2013). Široko su rasprostranjeni u biljnim vrstama gdje primarno služe kao molekule uključene u obranu od patogena i UV zračenja, a djelom su odgovorni za pigmentaciju i rast biljaka. Fenoli u biljkama nisu jednoliko raspoređeni – netopljivi fenoli čine sastavne dijelove staničnih stijenki, dok su topljivi fenoli raspoređeni unutar vakuola biljnih stanica. U hrani, fenoli mogu doprinijeti gorčini,

trpkosti, boji, okusu, mirisu i oksidativnoj stabilnosti proizvoda suzbijanjem biokemijskog i fizičkog propadanja namirnica (Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Kao dio prehrane, imaju velik značaj zbog svog biološkog učinka, koji uključuje antioksidativnu aktivnost te protuupalno i hepatoprotektivno djelovanje, a uz to štite organizam od pojave kardiovaskularnih, neurodegenerativnih i drugih kroničnih bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom.

Fenoli koji su prisutni u biljkama iz porodice *Amaranthaceae* (uključujući šećernu repu) obuhvaćaju fenolne kiseline i flavonoide. Fenolne kiseline (npr. hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina), flavonoli (npr. kvercetini) i flavoni pronađeni su u korijenu i listovima vrste *Beta vulgaris* (Vissers i sur., 2017). U ekstraktima listova šećerne repe utvrđena je prisutnost fenolnih kiselina uz značajan udio galne ( $344 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) i ferulinske kiseline ( $89,7 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), a identificirani su i flavonoidi među kojima se ističe kvercetin (El-Gengaihi i sur., 2016). Vjeruje se da kvercetin može zaštititi jetru od oštećenja uzrokovanih hepatotoksinima, a to potvrđuje *in vivo* istraživanje koje ukazuje na hepatoprotektivno djelovanje ekstrakta lista šećerne repe uz poboljšanu aktivnost jetrenih, odnosno antioksidativnih enzima (El-Gengaihi i sur., 2016). Prisutnost fenolnih spojeva, listovima šećerne repe daje dodatnu vrijednost radi kemijske stabilnosti, lake identifikacije, široke distribucije i kemijske varijabilnosti koje čine fenole korisnima za višestruke funkcije i primjene (Shahidi i Ambigaipalan, 2015) – poboljšanje kvalitete i trajnosti prehrambenih proizvoda, primjena u znanosti o materijalima i upotreba bioaktivnih molekula za prevenciju bolesti kod ljudi i životinja.

#### 2.2.2.1. Potencijalna primjena fenola i njihovih ekstrakata

Zbog svojih antioksidativnih i antimikrobnih svojstava, fenolni spojevi u prehrambenim proizvodima mogu predstavljati idealnu zamjenu za konzervanse – npr. ferulinska kiselina (antioksidans) klasificira se kao prehrambeni aditiv (Alam, 2019). Budući da se vlakana koja sadrže fenolne spojeve ne mogu dodavati proizvodima u visokim postocima, fenoli iz takvih izvora mogu se nadomjestiti dodavanjem ekstrakata koji ih sadrže.

Fenolni spojevi iz biljnih izvora mogu se koristiti kao funkcionalni sastojci prehrambenih proizvoda u svrhu poboljšanja antioksidativnog kapaciteta prerađene hrane, ali i prevencije bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom, nastalih kao posljedica onečišćenog okoliša i ubrzanog načina života (Sarkar i Shetty, 2014). Također, karakterizacija fenolnih spojeva u hrani biljnog porijekla,

može povećati razumijevanje njihove uloge u očuvanju kvalitete i trajnosti namirnica, što potencijalno može riješiti globalne probleme sigurnosti hrane vezane uz velike razmjere kvarenja i rasipanja svježih proizvoda. Osim različitih fenolnih spojeva, biljni ekstrakti mogu sadržavati i druge bioaktivne spojeve koji mogu imati sličan, različit ili komplementaran biološki kapacitet u odnosu na fenole. Prilikom konzumacije, djelovanje pojedinačnih bioaktivnih komponenti može se modificirati sinergističkim, aditivnim ili antagonističkim interakcijama među njima, što posljedično može promijeniti njihov fiziološki učinak (Phan i sur., 2018). Kada se pojedinačni spoj sa željenim biološkim svojstvom želi upotrijebiti kao dodatak prehrani, često su potrebne velike doze. Međutim, korištenjem ekstrakata s odgovarajućim sastavom omogućeno je smanjenje potrebnih doza, upravo radi kumulativnog učinka pojedinih spojeva prisutnih u ekstraktu.

Istražena je i upotreba fenola (fenolnih kiselina i flavonoida), dobivenih iz biljnih izvora, kao sredstava za umrežavanje prilikom proizvodnje stabiliziranih želatinskih gelova i želatino-pektinskih koacervata (Gómez-Guillén i sur., 2011). Eksperiment je proveden u svrhu dokazivanja potencijalne upotrebe takvih gelova kao novih sastojaka za modifikaciju prehrambenih sustava. Gelovi umreženi fenolnim spojevima pokazuju veliku mehaničku čvrstoću i toplinsku stabilnost, te smanjeno bubrenje. Takva svojstva omogućavaju njihovu primjenu u obliku novih sastojaka hrane.

### **2.3. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM**

#### **2.3.1. Koncept zelene ekstrakcije**

U laboratorijskim uvjetima, ali i u prehrambenoj industriji, za ekstrakciju se uglavnom koristi niz konvencionalnih metoda – uglavnom ekstrakcije kruto-tekuće kao što su ekstrakcija po Soxhletu ili maceracija. Općenito, svaka metoda ekstrakcije najprije zahtijeva mehaničko razaranje stanica kako bi se omogućilo oslobađanje željenih komponenti iz kompleksnih staničnih struktura. Klasično razaranje izvodi se mehaničkim metodama (npr. mljevenjem, drobljenjem) ili toplinskim i kemijskim tretmanima, a takvi postupci mogu oštetiti ili smanjiti kvalitetu ekstrahiranih proizvoda (Chemat i sur., 2020). Osim toga, nedostaci konvencionalnih metoda uključuju korištenje velikog volumena toksičnih organskih otapala, dugotrajno provođenje ekstrakcije, visok unos energije, nisku selektivnost, nižu kvalitetu i prinos konačnog proizvoda te rizik za okoliš (Alexandre i sur., 2017). Kako bi se izbjegli spomenuti nedostaci, pojavile su se alternativne tehnike u skladu s konceptom „zelene ekstrakcije“, koje rezultiraju većim prinosom,

kraćim vremenom ekstrakcije te manjim troškovima i utjecajem na okoliš (Pojić i sur., 2018). Ove metode ekstrakcije su također poznate kao netoplinske jer je temperatura tijekom procesa relativno niska i ne utječe na stabilnost ekstrahiranih spojeva.

„Zelena ekstrakcija“ razvija se kao dio „zelene kemije“, programa za osmišljavanje, razvoj i primjenu kemijskih proizvoda i procesa koji reduciraju ili eliminiraju uporabu i proizvodnju supstanci opasnih po ljudsko zdravlje i okoliš. Spomenuti koncept ekstrakcije temeljen je na nekoliko principa koji uključuju (i) uporabu novih i obnovljivih izvora biljnih materijala, (ii) uporabu prirodnih odn. „zelenih“ otapala (uglavnom voda), (iii) smanjenje potrošnje energije optimizacijom procesa, (iv) dobivanje više ciljanih produkata iz jednog izvora, (v) korištenje čisteg i sigurnijeg protokola ekstrakcije s manjim brojem operacija te (vi) usmjerenje ka proizvodnji biorazgradivog i stabilnog ekstrakta bez prisutnih kontaminanata (Chemat i sur., 2012). Neke od zelenih tehnika koje najviše obećavaju su ekstrakcija potpomognuta enzima ili ultrazvukom (engl. *Ultrasound-assisted extraction, UAE*), mikrovalna ekstrakcija, ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem, ekstrakcija superkritičnim fluidima i ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (Azmir i sur., 2013). Među novim metodama ekstrakcije, primjena ultrazvuka se sve više ističe za primjenu u prehrambenoj industriji radi relativno jednostavnog korištenja, manjeg novčanog ulaganja i mogućnosti obrade namirnica bez dodatka aditiva. Također, korištenjem ultrazvuka kompletna ekstrakcija može se završiti unutar nekoliko minuta uz visoku ponovljivost, smanjenu potrošnju otapala i pojednostavljenu manipulaciju parametrima procesa.

### 2.3.2. Svojstva ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom mehanički je postupak koji se temelji na zvučnim valovima određenih frekvencija i amplituda koji ubrzavaju prijenos mase i topline, a time povećavaju propusnost staničnih stijenki i membrana te stimuliraju oslobađanje staničnog sadržaja (Chemat i sur., 2017), a rezultat je bolji prinos i kraće vrijeme ekstrakcije. U tu svrhu koristi se ultrazvuk visoke snage ( $10\text{-}1000\text{ W cm}^{-2}$ ) i niske frekvencije (20-100 kHz) koji uzrokuje oštećenja biološkog materija kroz koji prolazi (Li i sur., 2021). Za razarajući učinak ultrazvučnih valova odgovorna su njihova fizikalna i kemijska svojstva. Sonokemijski učinci ultrazvuka uglavnom su posljedica fenomena akustične kavitacije (Chemat i sur., 2017). Kavitacija je pojava koja obuhvaća stvaranje, širenje i imploziju mjehurića plina, a nastala je kao posljedica promjene tlaka uslijed

uzastopne ekspanzije i kompresije vrtloga stvorenih tijekom širenja ultrazvučnog vala tekućim medijem (Tiwari, 2015). Tijekom implozije, unutar mjehurića postižu se vrlo visoke temperature (približno 5500 K) i tlakovi (približno 50 MPa), koji rezultiraju nekolicinom reakcija oko implodirajućeg mjehurića. Oscilacijama i implozijom kavitacijskih mjehurića javljaju se udarni valovi, mikro-mlazovi, turbulencije i posmične sile – pojave koje rezultiraju fragmentacijom, erozijom, sonoporacijom, razaranjem staničnih struktura i dr. (Wen i sur., 2019). Prag kavitacije ovisi o fizikalnim svojstvima – karakteristikama ultrazvučnog vala (frekvencija i intenzitet), amplitudi nastalog tlaka, temperaturi, početnom polumjeru mjehurića i svojstvima tretiranog medija, odnosno odabranog otapala kao što su viskoznost i površinska napetost (Tiwari, 2015). Tijekom ultrazvučne ekstrakcije, na tretman utječu i ulazna snaga, dizajn uređaja te oblik sonde. Zaključno, spomenuta fizikalna svojstva ultrazvučnih valova i posljedice kavitacije omogućuju provedbu ekstrakcije željenih spojeva iz uzoraka hrane (i) ulaskom otapala u matriks uslijed razaranja staničnog materijala i smanjenja veličine čestica; (ii) izdvajanjem ekstrakata iz matriksa povećanjem kontaktne površine između čvrste i tekuće faze. Najveća učinkovitost ultrazvučne ekstrakcije, kada se promatra prinos i konačan sastav dobivenih ekstrakata, postiže se povećanjem ultrazvučne snage, smanjenjem udjela vlage u uzorku (bolji kontakt otapalo-krutina) i optimizacijom temperature u svrhu kraćeg vremena tretiranja (Chemat i sur., 2017).

### 2.3.3. Izvedbe uređaja

Ultrazvuk visoke snage može se primijeniti za ekstrakciju pomoću dvije vrste uređaja – ultrazvučne kupelji i ultrazvučnog aparata. Ultrazvučnu kupelj čini spremnik od nehrđajućeg čelika s jednim ili više ultrazvučnih pretvarača na dnu koji energiju transformiraju u ultrazvučne valove, generatora koji električnu energiju iz ulaznog izvora prevodi u prikladan oblik za napajanje pretvarača (Kulkarni i Rathod, 2014) i regulatora temperature. Takve kupelji su jeftine, lako dostupne i istovremeno se u njima može tretirati veliki broj uzoraka. Međutim, u usporedbi s ultrazvučnim aparatima, karakterizira ih niža ponovljivost i snaga ultrazvuka koja se prenosi na uzorak (Kulkarni i Rathod, 2014). Ultrazvučni aparat koristi sondu koja je tijekom tretmana uronjena u uzorak, što rezultira izravnim prijenosom ultrazvučnih valova u medij s minimalnim gubitkom ultrazvučne energije. Sonde se razlikuju s obzirom na duljinu, promjer i strukturu vrha, a odabiru se u skladu s primjenom i volumenom uzorka koji se tretira. Intenzitet ultrazvučnih



valova tijekom tretmana izaziva naglo povećanje temperature u sustavu, stoga je uzorak istovremeno potrebno hladiti.

#### 2.3.4. Ultrazvučna ekstrakcija proteina i sekundarnih biljnih metabolita

Primjena ekstrakcije potpomognute ultrazvukom u prehrambenoj i srodnim industrijama uključuje tretiranje biljnih i životinjskih materijala u svrhu dobivanja visokovrijednih proteinskih ekstrakata ili ekstrakata sekundarnih metabolita (polifenolni, aromatski i drugi funkcionalni spojevi), polisaharida, vlakana i dr. (Chemat i sur., 2017) koji se mogu koristiti kao nutritivni i funkcionalni sastojci hrane.

U skladu s trenutnim naporima održivog razvoja, povezanim s iskorištenjem prehrambeno-poljoprivrednih nusproizvoda, korištenje ultrazvuka u istraživanjima biljnih proteina usmjereno je na (i) poboljšanje ekstrakcije biljnih proteina i modifikaciju dobivenih ekstrakata, te (ii) fizikalne, kemijske (stvaranje slobodnih radikala), funkcionalne (topljivost, emulgiranje, pjenjenje i želiranje) i nutritivne modifikacije (aminokiselinski sastav, probavljivost) proteinskih izolata biljnog porijekla (Rahman i Lamsal, 2021; Wen i sur., 2019). Fizikalna svojstva proteina koja se mijenjaju pod utjecajem ultrazvuka su veličina molekula, reološka svojstva, električna vodljivost i zeta potencijal, a takve promjene nastaju kao posljedica smicanja izazvanog kavitacijom (Rahman i Lamsal, 2021). Promjene funkcionalnih svojstava proteina ovise o intenzitetu ultrazvučne energije primijenjene tijekom tretmana, a modificiraju se ovisno o željenoj primjeni. Poboljšana topljivost proizlazi iz promjena sekundarne i tercijarne strukture proteina, bolje izloženosti hidrofилnih skupina aminokiselina otapalu i porasta temperature u sustavu; odnosno povećanja kontaktne površine proteina s vodom (Wen i sur., 2019). Bolje svojstvo formiranja proteinskog gela posljedica je promjene količine naboja na površini molekule i agregacije podjedinica čime jača mrežna struktura gela. Ultrazvučnim tretmanom dolazi i do poboljšanja svojstva pjenjenja i emulgiranja – čestice se ravnomjernije raspršuju, a hidrofobne aminokiseline postaju izloženije uslijed razmatanja strukture proteina.

Osim proteina, korištenje ultrazvuka osigurava ekstrakciju bioaktivnih sekundarnih biljnih metabolita iz velikog broja poljoprivrednih izvora, a pri tom smanjuje vrijeme trajanja ekstrakcije i potrošnju energije (Pradal i sur., 2018) te povećava prinos ekstrahiranih spojeva (Peng i sur., 2013). Učinkovitost procesa povećava se s brojem ekstrakcijskih ciklusa i korištenjem optimalnih

pH vrijednosti koje određuju topljivost analita u ekstrakcijskom otapalu, dok temperature tretmana više od 25 °C mogu dovesti do razgradnje polifenolnih i sličnih spojeva te smanjiti prinos ultrazvučne ekstrakcije (Cravotto i Binello, 2016). Fenolni ekstrakti dobiveni iz biljnih materijala uvijek su mješavina različitih skupina fenola koji su topljivi u korištenom ekstrakcijskom otapalu i drugih molekula koje su ekstrahirane zajedno s polifenolima, stoga je za dobivanje visokokvalitetnih proizvoda uglavnom potrebno dodatno pročišćavanje (Pradal i sur., 2018; Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

## **2.4. ANALITIČKE METODE ANALIZE UKUPNIH PROTEINA I FENOLA**

### **2.4.1. Kvantitativno određivanje udjela ukupnih proteina**

Nakon provedene ekstrakcije potrebno je odrediti koncentraciju ukupnih proteina u ekstraktima, radi provjere uspješnosti eksperimenta. Izbor metode za kvantitativno određivanje ukupnih proteina ovisi o vrsti i količini ispitivanog uzorka kao i o pretpostavljenoj koncentraciji proteina u ekstraktu. Najčešće korištene metode su kolorimetrijske (Biuret, Lowry i Bradford metoda), a temelje se na reakciji proteina s određenim reagensom pri čemu nastaje obojeni kompleks. Intenzitet boje nastalog kompleksa mjeri se spektrofotometrijski na određenoj valnoj duljini, a dobivena apsorbancija proporcionalna je koncentraciji proteina. Za izračun koncentracije ukupnih proteina potrebno je prethodno konstruirati baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina u uzorku, za što se najčešće koristi niz otopina goveđeg serumskog albumina (engl. *bovine serum albumin*, *BSA*) poznatih koncentracija.

Biuret metoda jedna je od najčešće korištenih metoda zbog svoje točnosti i neovisnosti o aminokiselinskom sastavu proteina. Temelji se na principu biuret reakcije, gdje zagrijavanjem 2 mola uree nastaje biurea koja u reakciji s otopinom bakrova sulfata u lužnatim uvjetima daje ljubičasto obojeni kompleks, s apsorpcijskim maksimumom na 540 nm (Chang i Zhang, 2017). Nedostatak ove metode je relativno niska osjetljivost (0-0,1 mg). Metoda po Bradfordu uključuje primjenu komercijalno dostupnog reagensa (Bradfordov reagens) koji sadrži boju Coomassie brilliant blue G-250 i veže bočne skupine određenih aminokiselina, pri čemu dolazi do stvaranja kompleksa plave boje. Apsorbancija se mjeri pri 595 nm UV/Vis spektrofotometrom. Metoda je jednostavna i jeftina, a boja je stabilna i brzo se razvija. Kod Lowry metode princip određivanja temelji se na reakciji iona bakra s amino skupinama peptidnih veza u lužnatim uvjetima, a nastali kompleks reagira s Folin-Ciocalteu reagensom pri čemu se razvija plavo-ljubičasto obojenje,

proporcionalno apsorbanciji i mjerljivo na valnoj duljini od 740 nm. Metoda ima slabu specifičnost i mogu nastati brojne interferencije reagensa s drugim tvarima u uzorku.

#### 2.4.2. Kvantitativno određivanje udjela ukupnih fenola

Folin-Ciocalteu metoda jedna je od najčešćih kolorimetrijskih metoda korištenih za određivanje ukupnih fenola, a temelji se na reakcijama disocijacije protona fenolnog spoja i nastajanja fenoksidnog iona koji reducira Folin-Ciocalteu reagens do plavo obojenih volframovih i molibdenovih oksida (Sánchez-Rangel i sur., 2013). Intenzitet plavog obojenja mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm. Folin-Denis metoda također se koristi za određivanje ukupnog sadržaja fenola u hrani biljnog porijekla. Kao i Folin-Ciocalteu metoda, temelji se na redukciji fosfomolibdinsko-fosfovolframske kiseline (Folin-Denis reagens) u plavo obojeni kompleks u lužnatom mediju, uz prisutnost fenolnih spojeva (Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Osim metoda za određivanje ukupnih fenola, razvijen je niz spektrofotometrijskih metoda za kvantifikaciju različitih fenolnih spojeva u biljnim materijalima. Ovi se testovi temelje na drugačijim principima i koriste se za određivanje pojedinih skupina fenolnih spojeva. Primjer takvih postupaka je vanilin metoda koja se koristi za kvantitativno određivanje proantocijanidina (kondenziranih tanina) u biljnim materijalima, a temelji se na specifičnosti flavan-3-ola, dihidrohalkona i proantocijanidina da reagiraju s vanilinom, uslijed čega nastaju obojeni spojevi (Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Intenzitet obojenja mjeri se spektrofotometrijski pri 500 nm.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

Ekperimentalni dio rada čine tri segmenta – prvi dio istraživanja uključuje ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom visoke snage i toplinsku ekstrakciju, provedenu na osušenim i svježim uzorcima lista šećerne repe, pri različitim uvjetima tretmana. U drugom dijelu, dobivenim ekstraktima je spektrofotometrijski određena koncentracija ukupnih proteina i ukupnih fenola. Završni dio istraživanja, uključuje statističku obradu izlaznih podataka.

#### **3.1. MATERIJALI**

##### **3.1.1. List šećerne repe**

U istraživanju su korišteni listovi šećerne repe, u suhom i svježem obliku. Sušeni listovi isporučeni su od strane partnera iz Turske, dok su svježi listovi dobiveni od lokalnog obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva. Radi lakšeg provođenja ekstrakcije, listovi su prilikom pripreme uzoraka usitnjeni u prah (suhi list) i sitne komadiće (svježi odmrznuti list). Uzorci za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom visoke snage i toplinsku ekstrakciju pripremljeni su na način da se 2,0000 g lista šećerne repe pomiješa s 100 mL deionizirane vode.

##### *3.1.1.1. Označavanje uzoraka*

Za svaki oblik lista šećerne repe (suhi i svježi), pripremljen je 21 uzorak u omjeru 1:50 (w/v). Od toga, 3 uzorka su podvrgnuta tretmanu toplinske ekstrakcije, dok su ostali tretirani ultrazvukom visoke snage – 9 uzoraka pripremljeno je uz dodatak hladne deionizirane vode, a drugih 9 uzoraka pripremljeno je uz dodatak deionizirane vode sobne temperature. Svi uzorci podvrgnuti ultrazvučnoj ekstrakciji su tijekom tretmana hlađeni ledom (slika 2). Uzorci pripremljeni za ekstrakcije, označavani su metodologijom koja je prikazana u tablici 1.

**Tablica 1.** Osnovne oznake uzoraka pripremljenih za tretmane ekstrakcija i njihovo značenje

OZNAKA UZORKA	ZNAČENJE OZNAKE
LUDI	Suhi uzorak lista šećerne repe uz dodatak deionizirane vode sobne temperature, hlađen ledom, tretiran ultrazvukom visoke snage
LUDW	Suhi uzorak lista šećerne repe uz dodatak hladne deionizirane vode, hlađen ledom, tretiran ultrazvukom visoke snage
LUWI	Svježi uzorak lista šećerne repe uz dodatak deionizirane vode sobne temperature, hlađen ledom, tretiran ultrazvukom visoke snage
LUWW	Svježi uzorak lista šećerne repe uz dodatak hladne deionizirane vode, hlađen ledom, tretiran ultrazvukom visoke snage
LDO	Suhi uzorak lista šećerne repe uz dodatak deionizirane vode sobne temperature, toplinski ekstrahiran
LWO	Svježi uzorak lista šećerne repe uz dodatak deionizirane vode sobne temperature, toplinski ekstrahiran

Uzorcima je uz osnovnu oznaku pridodana i brojčana oznaka kojom je obilježen način obrade s obzirom na definirane parametre ekstrakcija (Tablica 2).

**Tablica 2.** Brojčane oznake pridodane osnovnoj oznaci uzorka i njihovo značenje

BROJČANA OZNAKA	ZNAČENJE BROJČANE OZNAKE
1-9	Tretirano ultrazvukom visoke snage uz 9 različitih kombinacija amplitude i vremena trajanja
/3, /6, /9	Tretirano toplinskom ekstrakcijom u kupelji 3, 6 i 9 minuta pri 60 °C

### 3.1.2. Kemikalije i standardi

1. Deionizirana voda (PBF, Zagreb, Hrvatska)
2. Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

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

3. 20 %-tna otopina natrijeva karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

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

4. 0,1 M otopina natrijeva hidroksida (NaOH)

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

5. Reagens A: 2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 0,1 M NaOH

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

6. 1 %-tna otopina K-Na-tartarata

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

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

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

8. Reagens C

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

9. Galna kiselina (Acros Organics, New Jersey, USA)

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

### 3.1.3. Aparatura i pribor

#### 3.1.3.1 Aparatura

1. Analitička vaga NBL-254i Nimbus (Adam Equipment Inc., Oxford, SAD)
2. Centrifuga 5430 (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
3. pH metar HI5521-02 (Hanna Instruments Inc., Zagreb, Hrvatska) HI5522
4. Testna (klima) komora HPP110 (Mettler GmbH, Schwabach, Njemačka)

5. Ultrazvučna kupelj DT 100 H s grijanjem (Bandelin, Berlin, Njemačka)
6. Ultrazvučni aparat Q700CA Sonicator (Qsonica, Newtown, SAD)
7. UV-VIS Spektrofotometar UV-2600i s opcijском ISR2600Plus integrirajućom sferom i programskom podrškom LabSolutions UV-Vis (Shimadzu, Kyoto, Japan)
8. Vakuumpumpa Rocker 300 (Witeg, Wertheim, Njemačka)
9. Vortex uređaj MX-S (Dlab, Peking, Kina)

### *3.1.3.2. Pribor*

1. Büchnerov lijevak
2. Odsisna boca
3. Celulozni filter papir
4. Laboratorijska žlica
5. Menzura (100 mL)
6. Pipetman Gilson (200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L, 5 mL)
7. Odmjerne tikvice (10 mL, 200 mL)
8. Plastične epruvete (Falcon) (50 mL)
9. Plastične ladice za vaganje
10. Plastična posuda
11. Staklene čaše (250 mL)
12. Staklene epruvete
13. Kvarcne kivete
14. Staklena laboratorijska boca (500 mL)
15. Staklene pipete (1 mL, 5 mL)
16. Propipeta
17. Stakleni lijevci
18. Stalak za epruvete
19. Špatula
20. Tarionik s tučkom
21. Termometar
22. Eksikator
23. Staklene posudice

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visoke snage

U prvom dijelu eksperimenta, provedena je ekstrakcija proteina i sekundarnih biljnih metabolita iz lista šećerne repe potpomognuta ultrazvukom, upotrebom ultrazvučnog aparata Q700CA Sonicator (20 kHz), uz deioniziranu vodu kao zeleno ekstrakcijsko otapalo. Promjer sonde ultrazvučnog aparata iznosio je 12 mm. Tretman je proveden pri različitim vrijednostima amplitude (50, 75 i 100 %) i vremena trajanja (3, 6 i 9 min) za 4 serije uzoraka (LUDI, LUDW, LUWI i LUWW) kao što je prikazano u tablici 3. Tijekom provedbe ekstrakcije pojedinog uzorka, temperatura nije smjela prelaziti 40 °C kako bi se izbjegla denaturacija termolabilnih proteina prisutnih u listu šećerne repe.

**Tablica 3.** Varijacije parametara (amplituda i vrijeme) ekstrakcije potpomognute ultrazvukom za pojedine uzorke

UZORAK				AMPLITUDA [%]	VRIJEME [min]
LUDI1	LUDW1	LUWI1	LUWW1	75	6
LUDI2	LUDW2	LUWI2	LUWW2	75	3
LUDI3	LUDW3	LUWI3	LUWW3	50	6
LUDI4	LUDW4	LUWI4	LUWW4	50	9
LUDI5	LUDW5	LUWI5	LUWW5	75	9
LUDI6	LUDW6	LUWI6	LUWW6	100	9
LUDI7	LUDW7	LUWI7	LUWW7	50	3
LUDI8	LUDW8	LUWI8	LUWW8	100	6
LUDI9	LUDW9	LUWI9	LUWW9	100	3

#### 3.2.1.1. Postupak provedbe ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

U laboratorijsku čašu od 250 mL, pomoću analitičke vage, odvaži se  $2 \pm 0,1000$  g usitnjenog uzorka lista šećerne repe (suhi/svježi). U plastičnu posudu stave se kocke leda i određena količina vode radi boljeg prijenosa topline. Laboratorijska čaša s uzorkom namjesti se u posudu s ledom, nakon čega se uzorku doda 100 mL deionizirane vode – sobne temperature (22 °C), odnosno



hladne (4 °C). Tako pripremljen uzorak, stavlja se u kućište uređaja (slika 2). Kućište uređaja služi za zvučnu izolaciju zbog buke koju uređaj proizvodi uslijed soniciranja. U laboratorijsku čašu s uzorkom namjesti se ultrazvučna sonda koja se mora nalaziti u središtu čaše, uronjena u tekućinu oko 2,4 cm i biti dovoljno odmaknuta od dna. U čašu s uzorkom se postavi i termočlanak koji mjeri temperaturu sustava, na način da ne dodiruje stijenke čaše niti ultrazvučnu sondu. Prije tretmana, potrebno je zatvoriti zvučno izolirano kućište i na kontrolnom LCD ekranu uređaja unijeti odgovarajuće parametre ultrazvučne ekstrakcije u skladu s podacima iz tablice 3.



**Slika 2.** Uzorak lista šećerne repe postavljen u kućište ultrazvučnog uređaja Q700CA Sonicator (vlastita fotografija)

Tijekom trajanja ultrazvučne ekstrakcije pojedinog uzorka, svakih 15 sekundi tretmana, bilježene su vrijednosti temperature, snage i energije prikazane na kontrolnom ekranu. Ukupna promjena energije [W] u određenom vremenskom intervalu izračunata je prema jednadžbi:

$$P_{uk} = m \cdot c_p \cdot \frac{dT}{t} \quad [1]$$

gdje je  $P_{uk}$  ukupna promjena energije [W],  $m$  masa tretiranog uzorka (list šećerne repe i voda) [g],  $c_p$  specifični toplinski kapacitet lista šećerne repe [ $\text{J g}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ],  $dT$  promjena temperature u intervalu od 15 sekundi [ $^\circ\text{C}$ ] i  $t$  vrijeme [s].

Specifični toplinski kapacitet računat je za suhi i svježi list šećerne repe, prema jednadžbi:

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

gdje je  $c_p$  specifični toplinski kapacitet lista šećerne repe [ $\text{J g}^{-1} \text{°C}^{-1}$ ],  $x_n$  udio određene komponente lista šećerne repe (voda, ugljikohidrati, proteini, masti, pepeo),  $c_{pn}$  specifični toplinski kapacitet pojedine komponente (voda, ugljikohidrati, proteini, masti, pepeo) [ $\text{J g}^{-1} \text{°C}^{-1}$ ].

Korištenjem izračunatih vrijednosti ukupne promjene energije, dobivene su vrijednosti gustoće snage [ $\text{W cm}^{-3}$ ] s obzirom na volumen tretiranog uzorka (100 mL) i vrijednosti gustoće snage [ $\text{W cm}^{-2}$ ] s obzirom na površinu vrha ultrazvučne sonde (113,0973  $\text{mm}^2$ ).

Ekstrakti dobiveni nakon tretmana ultrazvukom visoke snage, filtriraju se uz pomoć Büchnerovog lijevka i boce za odsisavanje, spojene na vakuum pumpu. Filtrat koji sadrži ekstrahirane proteine i sekundarne biljne metabolite, prenosi se u falcon epruvete nakon čega slijedi spektrofotometrijsko određivanje ukupnih proteina i ukupnih fenola. Izdvojenim filtratima pojedinog ekstrakta, izmjerene su pH vrijednosti i električna vodljivost [ $\text{mS cm}^{-1}$ ] uz pomoć laboratorijskog pH-EC metra.

### 3.2.2. Toplinska ekstrakcija

Uz ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom visoke snage, provedena je i konvencionalna, toplinska ekstrakcija proteina i sekundarnih biljnih metabolita iz lista šećerne repe upotrebom ultrazvučne kupelji DT 100 H (35 kHz). Obzirom da je kupelj služila isključivo za zagrijavanje uzoraka, mogućnost soniciranja bila je isključena. Tretman je proveden pri 60 °C uz različito vrijeme trajanja (3, 6 i 9 min) za 2 serije uzoraka (LDO i LWO) kao što je prikazano u tablici 4.

**Tablica 4.** Varijacije trajanja toplinske ekstrakcije za pojedine uzorke

UZORAK		TEMPERATURA [°C]	VRIJEME [min]
LDO/3	LWO/3	60	3
LDO/6	LWO/6	60	6
LDO/9	LWO/9	60	9

### *3.2.2.1. Postupak provedbe konvencionalne - toplinske ekstrakcije*

Kupelj se napuni vodom do oznake i uključi se grijanje kupelji na 60 °C. Dok se voda u kupelji zagrijava, u laboratorijsku čašu od 250 mL odvaži se  $2 \pm 0,1000$  g usitnjenog suhog, odnosno svježeg uzorka lista šećerne repe i doda 100 mL deionizirane vode. Čaše s uzorcima se postave u kupelj te se termometrom prati porast temperature uzorka, a kada ona dostigne željenih 60 °C, čaše s uzorcima ostaju uronjene u kupelji zadani vremenski period (3, 6 i 9 min).

Nakon tretmana u kupelji, slijedi već opisana vakuum filtracija dobivenih ekstrakata te spektrofotometrijsko određivanje ukupnih proteina i ukupnih fenola iz izdvojenog filtrata. Kao i kod ultrazvučne ekstrakcije, filtratima je izmjerena pH vrijednosti i provodljivost [ $\text{mS cm}^{-1}$ ].

### *3.2.3. Određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom po Lowry-ju*

Lowry metoda je kolorimetrijska metoda za određivanje koncentracije proteina u otopini. Princip određivanja se temelji na reakciji iona bakra ( $\text{Cu}^{2+}$ ) s amino skupinama peptidnih veza u proteinima (lužnati medij), pri čemu se  $\text{Cu}^{2+}$  reducira u  $\text{Cu}^+$  uz tvorbu kompleksa  $\text{Cu}^+$ -protein (Richards i sur., 2020). Nastali kompleks reagira s Folin-Ciocalteau reagensom koji sadrži fosfovolframatnu i fosfomolibdensku kiselinu. Reakcijom dolazi do redukcije u volframove i molibdenove okside pri čemu se razvija karakteristično plavo-ljubičasto obojenje otopine, proporcionalno apsorbanciji (proporcionalno isključivo u linearnom području, odnosno u području od 0 do 1 izmjerene apsorbancije) i mjerljivo na valnoj duljini od 740 nm. Jakost obojenja dijelom ovisi o sadržaju aromatskih aminokiselina (tirozin, triptofan) i aminokiselinskih ostataka cistina (dimer cisteina), cisteina i histidina, koji sudjeluju u redukciji fosfovolframatne i fosfomolibdenske kiseline Folin-Ciocalteau reagensa uz kompleks  $\text{Cu}^+$ -protein (Richards i sur., 2020).

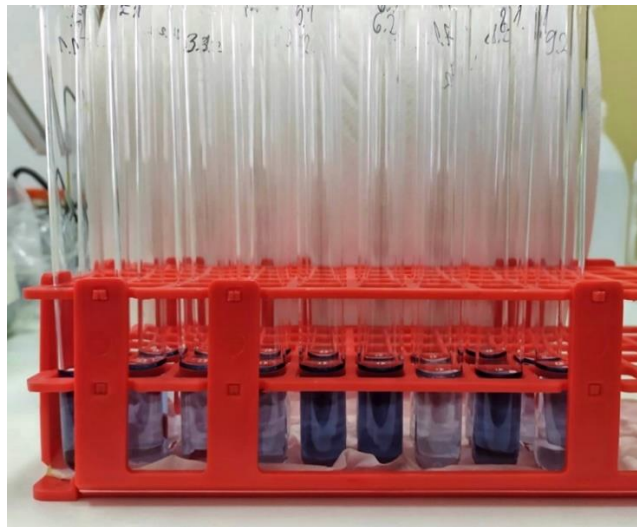
#### *3.2.3.1. Priprema uzorka za određivanje koncentracije ukupnih proteina*

Za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih proteina, filtrati dobiveni vakuum filtracijom ekstrakata najprije su centrifugirani 20 minuta pri  $7830 \text{ o min}^{-1}$ . Nakon toga, napravljena su razrjeđenja supernatanta s deioniziranom vodom u određenom omjeru. Centrifugirani ekstrakti dobiveni iz suhog lista šećerne repe razrijeđeni su 10 puta, dok su oni dobiveni iz svježeg lista šećerne repe razrijeđeni 5 puta. Razrjeđenja su rađena kako bi apsorbancija bila u linearnom području 0-1, jer je jedino u tom rasponu koncentracija proporcionalna apsorbanciji.

### 3.2.3.2. Postupak određivanja koncentracije ukupnih proteina

U staklenu epruvetu, uz pomoć pipetmana, otpipetira se 0,8 mL centrifugiranog filtrata i 4 mL reagensa C. Sadržaj epruvete se dobro promiješa na vortex uređaju i ostavi na sobnoj temperaturi 10 do 15 minuta, kako bi se provela reakcija. U epruvetu se zatim otpipetira 0,4 mL prethodno razrijeđenog Folin-Ciocalteau reagensa. Potrebno ga je dodati naglo i uz snažno miješanje na vortex uređaju, zbog njegove nestabilnosti u lužnatom mediju (reagens C). Priprema reakcijske smjese za određivanje ukupnih proteina provedena je u paraleli. Pripremljena je i jedna slijepa proba, koja umjesto centrifugiranog filtrata sadrži 0,8 mL ekstrakcijskog otapala, odnosno 0,8 mL deionizirane vode. Ovako pripremljeni uzorci i slijepa proba, ostave se u mraku pri sobnoj temperaturi tijekom 40 do 60 minuta. U navedenom periodu dolazi do reakcije i pojave plavo-ljubičastog obojenja reakcijske smjese (slika 3).

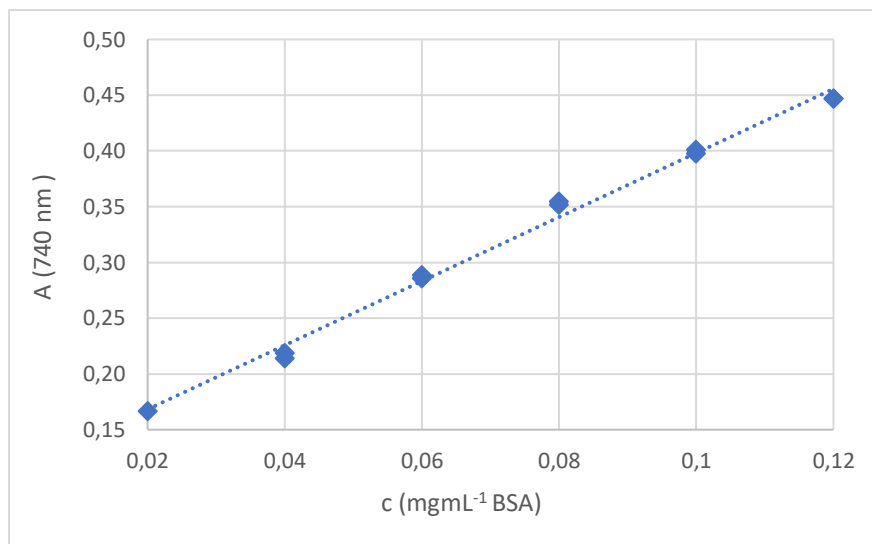
Apsorbancija se mjeri na UV-VIS spektrofotometru UV-2600i pri valnoj duljini od 740 nm. U kućište spektrofotometra stavlja se kvarcna kiveta sa slijepom probom i kvarcna kiveta s uzorkom kojem se želi izmjeriti apsorbancija. Izmjerene vrijednosti apsorbancije analiziraju se uz pomoć LabSolutions™ UV-Vis *software*-a. Dobivena koncentracija ukupnih proteina [ $\text{mg mL}^{-1}$ ], kao srednja vrijednost dvaju mjerenja, konačno je izražena s obzirom na udio suhe tvari (s.tv.) sušenog i svježeg uzorka lista šećerne repe [ $\text{mg (g}_{\text{s.tv.}})^{-1}$ ]. Spektrofotometrijskom određivanju koncentracije ukupnih proteina u uzorku prethodi izrada baždarnog dijagrama.



**Slika 3.** Plavo-ljubičasto obojenje reakcijske smjese postavljene za određivanje koncentracije ukupnih proteina u listu šećerne repe (*vlastita fotografija*)

### 3.2.3.3. Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije ukupnih proteina

Za određivanje nepoznate koncentracije ukupnih proteina u uzorku, potrebno je prethodno konstruirati dijagram ovisnosti izmjerene apsorbancije o poznatoj koncentraciji standarda goveđeg serumskog albumina (engl. *Bovine serum albumin, BSA*). Iz standardne otopine BSA koncentracije  $200 \text{ mg mL}^{-1}$ , u odmjernu tikvicu od 10 mL pripreme se otopine poznate koncentracije 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10 i 0,12  $\text{mg mL}^{-1}$ . Pripremljene otopine BSA koriste se za postavljanje reakcijske smjese uz dodatak reagensa C i Folin-Ciocalteu reagensa prema postupku opisanom u potpoglavlju 3.2.3.2. Apsorbancija proporcionalna intenzitetu obojenja, izmjeri se na spektrofotometru pri valnoj duljini od 740 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije i poznatih koncentracija otopina, pomoću programa Microsoft Excel, konstruira se baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije (ordinata) pri 740 nm o koncentraciji otopine (apscisa) BSA [ $\text{mg mL}^{-1}$ ] (slika 4).



**Slika 4.** Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA

Prema dobivenoj jednadžbi pravca baždarnog dijagrama:

$$y = 2,87376x + 0,110804 \quad R^2 = 0,99235 \quad [3]$$

gdje je  $y$  apsorbancija pri 740 nm,  $x$  koncentracija proteina [ $\text{mg mL}^{-1}$ ] i  $R^2$  koeficijent determinacije; korištenjem izmjerenih vrijednosti apsorbancije, može se odrediti nepoznata koncentracija ukupnih proteina u uzorcima lista šećerne repe.

#### 3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ukupnih fenola

Metoda određivanja ukupnih fenolnih spojeva, temelji se na kolorimetrijskoj reakciji, odnosno prijenosu elektrona između Folin-Ciocalteau reagensa i fenolnih spojeva (reducirajući agens). To je metoda koja se najčešće koristi za određivanje ukupnog sadržaja fenola u biološkim uzorcima i ekstraktima hrane, osobito hrane biljnog podrijetla (Lamuela-Raventós, 2017). Reakcija Folin-Ciocalteau reagensa i fenolnih spojeva odvija se pri  $\text{pH} \approx 10$ , a koji se postiže dodatkom  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . U lužnatim uvjetima, dolazi do disocijacije protona fenolnog spoja i nastaje fenoksid ion koji reducira Folin-Ciocalteau reagens do plavo obojenih volframovih i molibdenovih oksida (Sánchez-Rangel i sur., 2013). Intenzitet plavog obojenja, proporcionalan je koncentraciji ukupnih fenola u uzorku, a mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm. Izmjerena apsorbancija proporcionalna je koncentraciji isključivo u linearnom području, odnosno u području od 0 do 1 izmjerene apsorbancije.

##### 3.2.4.1. Postupak određivanja koncentracije ukupnih fenola

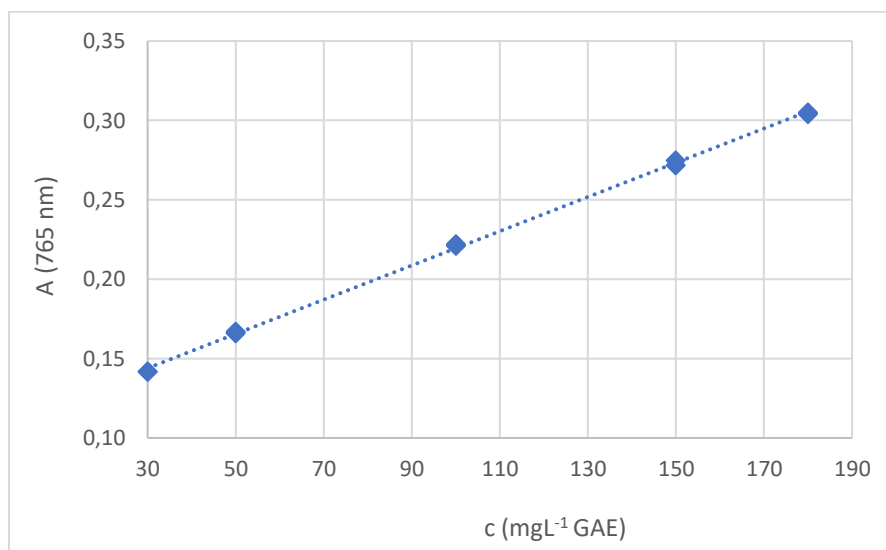
U staklenu epruvetu potrebno je redom dodati 7,9 mL deionizirane vode, 0,1 mL filtrata ekstrahiranog uzorka, 0,5 mL razrijeđenog Folin-Ciocalteau reagensa (1:2) te 1,5 mL pripremljene 20 %-tne otopine natrijeva karbonata. Priprema reakcijske smjese provedena je u paraleli, a napravljena je i slijepa proba koja umjesto filtrata sadrži 0,1 mL deionizirane vode. Nakon dodavanja svih komponenti, otopina se dobro promiješa na vortex uređaju i ostavi stajati 2 sata u mraku pri sobnoj temperaturi. Za određivanje ukupnih fenola, filtrati dobiveni nakon ekstrakcije uzoraka lista šećerne repe nisu podvrgnuti centrifugiranju niti su razrjeđivani.

Apsorbancija proporcionalna intenzitetu obojenja reakcijske smjese, mjeri se na UV-VIS spektrofotometru UV-2600i pri valnoj duljini od 765 nm. Mjerenje se provodi kao što je opisano u potpoglavlju 3.2.3.2., a potrebno je prethodno konstruirati baždarni dijagram, kao i kod određivanja ukupnih proteina.

##### 3.2.4.2. Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije ukupnih fenola

Za izradu dijagrama ovisnosti izmjerene apsorbancije o koncentraciji, prethodno je potrebno iz otopine standarda galne kiseline (engl. *Gallic acid*, GAE), koncentracije  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  pripremiti sljedeća razrjeđenja: 50, 100, 200, 300, 400, 600 i  $800 \text{ mg L}^{-1}$ . Nakon pripreme razrjeđenja, u

staklene epruvete dodaje se redom 7,9 mL deionizirane vode, 0,1 mL otopine standarda određene koncentracije, 0,5 mL razrijeđenog Folin-Ciocalteau reagensa (1:2) i 1,5 mL pripremljene 20 %-tne otopine natrijeva karbonata te se smjesa dobro promiješa na vortex uređaju. Nakon što je reakcijska smjesa 2 sata stajala u mraku, na spektrofotometru se pri valnoj duljini od 765 nm izmjeri apsorbancija. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija (ordinata) i poznatih vrijednosti koncentracija galne kiseline [ $\text{mg L}^{-1}$ ] (apskisa) konstruira se baždarni dijagram u programu Microsoft Excel 365 (slika 5).



**Slika 5.** Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

Prema dobivenoj jednadžbi pravca baždarnog dijagrama:

$$y = 0,00107826x + 0,111618 \quad R^2 = 0,99929 \quad [3]$$

gdje je  $y$  apsorbancija pri 765 nm,  $x$  koncentracija proteina [ $\text{mg L}^{-1}$ ] i  $R^2$  koeficijent determinacije; korištenjem izmjerenih vrijednosti apsorbancije, može se odrediti nepoznata koncentracija ukupnih fenola u uzorcima lista šećerne repe. Koncentracija ukupnih fenola [ $\text{mg L}^{-1}$  GAE] dobivena nakon spektrofotometrijskog mjerenja, kao i kod ukupnih proteina, izražena je s obzirom na udio suhe tvari [ $\text{mg (g}_{\text{s.tv.}})^{-1}$ ].

### 3.2.5. Određivanje suhe tvari sušenjem do konstantne mase

Suha tvar određena je sušenjem uzorka do konstantne mase pri  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  u testnoj (klima) komori. Standardna laboratorijska metoda određivanja suhe tvari/vlage sušenjem do konstantne mase

temeljena je na uklanjanju vode iz malih količina uzorka evaporacijom, a iz razlike u masi uzorka prije i nakon sušenja namirnice izračunava se udio suhe tvari, prema jednadžbi:

$$\text{suha tvar [\%]} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100 \quad [4]$$

gdje je  $m_0$  masa prazne posudice,  $m_1$  masa posudice s uzorkom prije sušenja i  $m_2$  masa posudice s uzorkom nakon sušenja.

#### *3.2.5.1. Postupak određivanja suhe tvari sušenjem do konstantne mase*

Staklene posudice potrebno je osušiti u testnoj (klima) komori na 105 °C i nakon toga ohladiti u eksikatoru (20-ak min). Osušenim i ohlađenim posudicama odredi se masa s točnošću od  $\pm 0,0002$  g. U izvagane posudice, izvaži se približno 2,5 g uzorka i stavi u testnu (klima) komoru na  $105^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$  tijekom sat vremena. Nakon provedenog sušenja, posudice s uzorkom potrebno je ohladiti u eksikatoru (20-ak min) i zatim ohlađene izvagati. Postupci sušenja, hlađenja i vaganja posudica s uzorkom ponavljaju se dok razlika nakon dva uzastopna sušenja u razmaku od pola sata ne bude manja od 0,001 g. Kompletan postupak određivanja suhe tvari sušenjem do konstantne mase, potrebno je provesti za suhi i svježiji uzorak lista šećerne repe. Udio suhe tvari, izračunat prema jednadžbi [4] izražen je u postotcima. Rezultati odvaga i izračuna prikazani su u tablici 15.

#### 3.2.6. Obrada podataka

##### *3.2.6.1. Statistička obrada podataka dobivenih nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visoke snage*

Eksperimentalni dizajn i optimizacija parametara ultrazvučne ekstrakcije uz maksimalne izlazne vrijednosti, provedeni su u programu STATGRAPHICS Centurion (Statgraphics Technologies Inc., Virginia, SAD). Eksperiment obuhvaća 4 serije po 9 uzoraka (LUDI1-9, LUDW1-9, LUWI1-9 i LUWW1-9). Korišten je faktorijalni dizajn s više razina utjecaja (engl. *Multilevel Factorial Design*) kojim se želi utvrditi potencijalni utjecaj ulaznih (nezavisnih) varijabli, na izlazne (zavisne) varijable. Ulazni parametri eksperimenta su amplituda (50, 75 i 100 %) i vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min), dok izlazne varijable uključuju ukupne proteine [ $\text{mg (g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$ )]<sup>1</sup>, ukupne fenole [ $\text{mg (g}_{\text{s.tv.}}^{-1}$ )]<sup>1</sup>, pH, električnu vodljivost [ $\text{m Scm}^{-1}$ ] i ukupnu promjenu energije [W].



Pri određivanju optimalnih uvjeta procesa korištena je metoda odzivne površine (engl. *Response Surface Methodology, RSM*) koja prikazuje utjecaj ulaznih varijabli na izlaznu varijablu kroz odzivnu funkciju. Također, optimiranjem uvjeta dobivene su vrijednosti amplitude i vremena tretiranja pri kojima se postižu maksimalne izlazne vrijednosti ukupnih proteina i fenola, pH, provodljivosti i ukupne promjene energije.

U programu STATGRAPHICS Centurion napravljena je i analiza varijance (engl. *Multivariate analysis of variance, MANOVA*) za svaku izlaznu varijablu, koja uzima u obzir interakcije između dva ulazna parametra i kvadratne interakcije pojedinog ulaznog parametra te provjerava imaju li utjecaja na pojedine izlazne vrijednosti ispitivanih svojstava. Parametri su imali statistički značajan utjecaj ako je  $p < 0,05$ , što ukazuje da se značajno razlikuju od nule u intervalu pouzdanosti od 95,0 %.

#### *3.2.6.2. Statistička obrada podataka dobivenih nakon toplinske ekstrakcije*

Izmjerene vrijednosti ukupnih proteina, ukupnih fenola, pH i provodljivosti statistički su obrađene pomoću programa Microsoft Excel 365. Korištena je ANOVA za određivanje statističke značajnosti utjecaja vremena tretiranja (3, 6 i 9 min) na izlazne vrijednosti izmjerenih svojstava, uz interval pouzdanosti od 95,0 %.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Tijekom provedbe istraživanja, sušeni i svježi uzorci lista šećerne repe podvrgnuti su ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visoke snage s ciljem određivanja prinosa ukupnih proteina i sekundarnih biljnih metabolita (ukupnih fenola). Ultrazvučna ekstrakcija korištena je zbog mogućnosti postizanja relativno niskih temperatura tretiranja (do 40 °C uz hlađenje) uz sprječavanje denaturacije, a odabrano ekstrakcijsko otapalo predstavlja deionizirana voda – jeftino, ekološki i tehnološki prihvatljivo „zeleno otapalo“. Za vrijeme trajanja pojedinog tretmana bilježene su vrijednosti temperature, snage i energije, naknadno sistematizirane u programu Microsoft Excel 365 gdje su računskim operacijama dobivene vrijednosti promjene temperature ( $dT$ ), ukupne promjene energije i gustoće snage. Uz netoplinu ekstrakciju, provedena je i toplinska metoda ekstrakcije u kupelji (pri 60 °C), radi usporedbe dobivenih prinosa ukupnih proteina i polifenola s obzirom na korištenu ekstrakcijsku tehniku, odnosno temperaturu tretmana.

Za određivanje koncentracije ukupnih proteina i fenola dobivenih ekstrakata korištena je spektrofotometrijska metoda pri čemu je apsorbancija mjerena na valnim duljinama od 740 nm (za proteine) i 765 nm (za polifenole). Dobiveni rezultati koncentracija obrađeni su u MS Excel 365 programu, preračunati s obzirom na suhu tvar uzorka lista šećerne repe i prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom. Osim prinosa, ekstraktima su izmjerene pH vrijednosti i električna vodljivost. Rezultati mjerenja tablično su prikazani uz rezultate koncentracija ukupnih proteina i polifenola za pojedine uzorke, korištenjem MS Excel 365. U istom programu, izrađen je grafički prikaz srednjih vrijednosti izmjerenih rezultata s obzirom na uzorke podvrgnute drugačijim uvjetima ekstrakcije (LUDI, LUDW, LUWI, LUWW, LDO i LWO).

Statistička obrada podataka ultrazvučne ekstrakcije napravljena je u programu STATGRAPHICS, uz ulazne varijable – amplituda (50, 75 i 100 %) i vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 minuta). Dobiveni rezultati analize prikazani su za svaki izlazni parametar u obliku Pareto dijagrama, MANOVA tablice, jednadžbe regresije, dijagrama odzivne površine i tablice optimalnih vrijednosti. Podaci toplinske metode ekstrakcije obrađeni su u MS Excel 365 programu, u obliku ANOVA tablice – utjecaj vremena tretiranja (3, 6 i 9 minuta) na svaki pojedini izlazni parametar.

#### 4.1. REZULTATI FIZIKALNIH PARAMETARA DOBIVENIH TIJEKOM EKSTRAKCIJE POTPOMOŽNE ULTRAZVUKOM

**Tablica 5.** Srednje vrijednosti podataka dobivenih za ultrazvučnu ekstrakciju uzorka LUDI

UZORAK	$t$ [min]	$A$ [%]	$T$ [°C]	$P$ [W]	$E$ [J]	$dT$ [°C]	$P_{uk}^*$ [W]	$P_v$ [W cm <sup>-3</sup> ]	$P_p$ [W cm <sup>-2</sup> ]
LUDI1	6	75	22,0417	61,7500	11.936,9167	0,6250	32,3541	0,3235	28,6074
LUDI2	3	75	21,2500	61,0833	6.443,0833	0,9167	37,6918	0,3769	33,3269
LUDI3	6	50	23,4583	63,2917	12.163,0417	1,1667	70,5327	0,7053	62,3646
LUDI4	9	50	20,3333	46,6667	13.391,8611	0,5833	32,1689	0,3217	28,4436
LUDI5	9	75	26,9167	66,0000	18.649,7778	0,5833	44,3558	0,4436	39,2191
LUDI6	9	100	31,5278	81,2778	23.157,6111	0,6944	36,6960	0,3670	32,4464
LUDI7	3	50	19,7500	47,1667	4.902,0000	0,8333	36,2084	0,3621	32,0152
LUDI8	6	100	28,2917	81,7500	15.798,2500	0,9167	51,3259	0,5133	45,3820
LUDI9	3	100	22,8333	78,4167	8.329,1667	1,4167	49,8155	0,4982	44,0466

\* za izračun [1] korišteno:  $m=102$  g;  $c_p$  (sušeni)= $1,2003$  J g<sup>-1</sup> °C<sup>-1</sup>; odnosno  $c_p$  (svježi)= $3,2816$  J g<sup>-1</sup> °C<sup>-1</sup>  $t$ -vrijeme tretiranja;  $A$ -amplituda;  $T$ -temperatura;  $P$ -snaga;  $E$ -energija;  $dT$ -promjena temperature;  $P_{uk}$ -ukupna promjena energije;  $P_v$ -gustoća snage s obzirom na volumen (100 mL),  $P_p$ -gustoća snage s obzirom na površinu vrha sonde (promjer 12 mm)

U tablici 5 prikazani su korišteni parametri tretmana UAE (vrijeme tretiranja i amplituda) za svaki od 9 uzoraka LUDI, a pripadajuće srednje vrijednosti (temperatura, snaga, energija, promjena temperature, ukupna promjena energije i gustoća snage) dobivene su računski korištenjem podataka izmjerenih nakon svakih 15 sekundi tretmana. Srednje vrijednosti temperature i energije postignute tijekom ekstrakcije, najviše su kod najintenzivnijeg tretmana (LUDI6) te iznose 31,5278 °C i 23.157,6111 J, dok se najniže vrijednosti (19,7500 °C i 4.902,0000 J) postižu prilikom tretmana najmanjeg intenziteta (LUDI7). Takva korelacija dobivenih vrijednosti i korištenih parametara ekstrakcije je očekivana i logična. Međutim, kod srednjih vrijednosti snage, odnos rezultata i korištenih parametara je nešto drugačiji, s obzirom da se najveća vrijednost snage javlja kod uzorka LUDI8 (81,7500 W), a najniža kod uzorka LUDI4 (46,6667 W). Ultrazvučna snaga je proporcionalna ultrazvučnoj amplitudi, a potencijalni razlog odstupanja je nastajanje aglomerata u pojedinim uzorcima, budući da je za njihovo razbijanje

potrebno uložiti veću snagu. Odstupanje se javlja i kod rezultata ukupne promjene energije, gdje najvišu vrijednost ima uzorak LUDI3 (70,5327 W), a razlog tome je ovisnost ukupne promjene energije o promjeni temperature u sustavu tijekom vremena [1].

**Tablica 6.** Srednje vrijednosti podataka dobivenih za ultrazvučnu ekstrakciju uzorka LUDW

UZORAK	$t$ [min]	$A$ [%]	$T$ [°C]	$P$ [W]	$E$ [J]	$dT$ [°C]	$P_{uk}^*$ [W]	$P_v$ [W cm <sup>-3</sup> ]	$P_p$ [W cm <sup>-2</sup> ]
LUDW1	6	75	23,0417	63,4583	12.460,4167	0,8750	34,5318	0,3453	30,5328
LUDW2	3	75	17,6667	64,0000	6.704,5833	1,1667	36,5520	0,3655	32,3191
LUDW3	6	50	18,6667	46,5417	9.134,6667	0,6667	26,2462	0,2625	23,2068
LUDW4	9	50	21,3056	47,3889	13.464,7778	0,6111	35,6195	0,3562	31,4946
LUDW5	9	75	26,2778	66,5833	18.894,0556	0,7778	49,5657	0,4957	43,8257
LUDW6	9	100	29,8056	84,2222	23.938,1111	0,8889	57,3408	0,5734	50,7004
LUDW7	3	50	15,0833	46,5833	4.902,1667	1,0000	32,4709	0,3247	28,7106
LUDW8	6	100	26,2500	80,5000	15.830,3750	1,0833	55,0677	0,5507	48,6905
LUDW9	3	100	20,5000	78,4167	8.410,5833	1,5833	51,3278	0,5133	45,3838

\* za izračun [1] korišteno:  $m=102$  g;  $c_p$  (sušeni)= $1,2003$  J g<sup>-1</sup> °C<sup>-1</sup>; odnosno  $c_p$  (svježi)= $3,2816$  J g<sup>-1</sup> °C<sup>-1</sup>  
 $t$ -vrijeme tretiranja;  $A$ -amplituda;  $T$ -temperatura;  $P$ -snaga;  $E$ -energija;  $dT$ -promjena temperature;  $P_{uk}$ -ukupna promjena energije;  $P_v$ -gustoća snage s obzirom na volumen (100 mL),  $P_p$ -gustoća snage s obzirom na površinu vrha sonde (promjer 12 mm)

Kod uzorka LUDW (tablica 6), srednje vrijednosti temperature, snage i energije, kao i ukupna promjena energije najviše su kod najintenzivnijeg tretmana (LUDW6) te redom iznose 29,8056 °C; 84,2222 W; 23.938,1111 J i 57,3408 W. Najniže srednje vrijednosti temperature i energije (15,0833 °C i 4.902,1667 J) postižu se tijekom tretmana najmanjeg intenziteta (LUDW7), dok uzorak LUDW3 pokazuje najniže vrijednosti snage (46,5417 W) i ukupne promjene energije (26,2462 W).

**Tablica 7.** Srednje vrijednosti podataka dobivenih za ultrazvučnu ekstrakciju uzorka LUWI

UZORAK	$t$ [min]	A [%]	$T$ [°C]	$P$ [W]	$E$ [J]	$dT$ [°C]	$P_{uk}^*$ [W]	$P_v$ [W cm <sup>-3</sup> ]	$P_p$ [W cm <sup>-2</sup> ]
LUWI1	6	75	22,5000	60,5000	11.690,6667	0,7500	103,2889	1,0329	91,3274
LUWI2	3	75	20,0000	60,0833	6.258,5833	1,0000	109,3704	1,0937	96,7047
LUWI3	6	50	21,0000	45,1667	8.756,4583	0,5417	71,6304	0,7163	63,3352
LUWI4	9	50	21,9722	44,8333	12.948,5278	0,4444	84,5653	0,8457	74,7722
LUWI5	9	75	25,4444	63,2222	17.980,4444	0,6389	106,0425	1,0604	93,7622
LUWI6	9	100	26,4444	80,9722	23.037,6389	0,8056	153,6507	1,5365	135,8571
LUWI7	3	50	15,2500	45,0000	4.811,9167	0,7500	59,7460	0,5975	52,8270
LUWI8	6	100	26,3333	78,0417	15.349,6667	0,8750	147,4204	1,4742	130,3483
LUWI9	3	100	22,7500	75,6667	8.017,7500	1,1667	105,4218	1,0542	93,2134

\* za izračun [1] korišteno:  $m=102$  g;  $c_p$  (sušeni)=1,2003 J g<sup>-1</sup> °C<sup>-1</sup>; odnosno  $c_p$  (svježi)=3,2816 J g<sup>-1</sup> °C<sup>-1</sup>  
 $t$ -vrijeme tretiranja; A-amplituda;  $T$ -temperatura;  $P$ -snaga;  $E$ -energija;  $dT$ -promjena temperature;  $P_{uk}$ -ukupna promjena energije;  $P_v$ -gustoća snage s obzirom na volumen (100 mL),  $P_p$ -gustoća snage s obzirom na površinu vrha sonde (promjer 12 mm)

Usporedbom podataka u tablici 7 utvrđeno je da uzorak LUWI6, tretiran uz najintenzivnije uvjete obrade, pokazuje najviše vrijednosti temperature, snage, energije i ukupne promjene energije (26,4444 °C; 80,9722 W; 23.037,6389 J i 153,6507 W). Sukladno tome, uzorak tretiran uz najblaže uvjete ekstrakcije (LUWI7), daje najniže vrijednosti temperature, energije i ukupne promjene energije (15,2500 °C; 4.811,9167 J i 59,7460 W). Iznimka je srednja vrijednost snage, najniža kod uzorka LUWI4.

**Tablica 8.** Srednje vrijednosti podataka dobivenih za ultrazvučnu ekstrakciju uzorka LUWW

UZORAK	$t$ [min]	A [%]	$T$ [°C]	$P$ [W]	$E$ [J]	$dT$ [°C]	$P_{uk}$ [W]	$P_v$ [W cm <sup>-3</sup> ]	$P_p$ [W cm <sup>-2</sup> ]
LUWW1	6	75	20,0833	58,2917	11.438,9167	0,8750	89,5337	0,8953	79,1651
LUWW2	3	75	17,7500	56,7500	5.996,2500	1,0833	78,3604	0,7836	69,2858
LUWW3	6	50	16,4167	44,1667	8.826,4167	0,7083	74,6904	0,7469	66,0408
LUWW4	9	50	18,7778	45,8333	12.961,0833	0,5833	83,5047	0,8350	73,8344
LUWW5	9	75	23,5000	63,0000	17.938,6944	0,7222	94,7019	0,9470	83,7349
LUWW6	9	100	27,3333	79,1667	22.562,8889	0,8333	128,1908	1,2819	113,3456
LUWW7	3	50	14,6667	78,0833	4.795,8333	0,7500	52,6715	0,5267	46,5718
LUWW8	6	100	24,2500	77,0417	15.188,7083	1,0000	117,3286	1,1733	103,7413
LUWW9	3	100	16,9167	74,7500	8.012,5833	1,3333	93,4230	0,9342	82,6041

\* za izračun [1] korišteno:  $m=102$  g;  $c_p$  (sušeni)=1,2003 J g<sup>-1</sup> °C<sup>-1</sup>; odnosno  $c_p$  (svježi)=3,2816 J g<sup>-1</sup> °C<sup>-1</sup>  
 $t$ -vrijeme tretiranja; A-amplituda;  $T$ -temperatura;  $P$ -snaga;  $E$ -energija;  $dT$ -promjena temperature;  $P_{uk}$ -ukupna promjena energije;  $P_v$ -gustoća snage s obzirom na volumen (100 mL),  $P_p$ -gustoća snage s obzirom na površinu vrha sonde (promjer 12 mm)

Podaci iz tablice 8 pokazuju rezultate razmjerne prethodnim uzorcima, gdje LUWW6, uz najdulje vrijeme trajanja tretmana i najveću vrijednost amplitude, daje najviše izračunate vrijednosti parametara temperature, snage, energije i ukupne promjene energije (27,3333 °C; 79,1667 W; 22.562,8889 J i 128,1908 W). Također, korelaciju slijedi i uzorak LUWW7 koji pokazuje najniže vrijednosti temperature, energije i ukupne promjene energije, uz iznimku srednje vrijednosti snage koja je najniža kod uzorka LUWW3.

S obzirom na temperaturu ekstrakcijskog otapala – dodatak deionizirane vode sobne temperature (LUDI i LUWI) ili hladne deionizirane vode (LUDW i LUWW), srednje vrijednosti temperature tijekom tretmana generalno su niže kod uzoraka s dodatkom hladne deionizirane vode kao ekstrakcijskog otapala (LUDW i LUWW), dok su istovremeno ostale vrijednosti (snaga, energija, ukupna promjena energije i gustoća snage) kod uzorka LUDI uglavnom niže u odnosu na uzorak LUDW, a kod uzorka LUWI više u usporedbi s uzorkom LUWW. Ovakvom usporedbom može se zaključiti da temperatura korištenog ekstrakcijskog otapala utječe na ukupnu temperaturu sustava tijekom ultrazvučne ekstrakcije, ali ne pokazuje izravan utjecaj na povećanje

ili smanjenje vrijednosti ostalih parametara. Istovremeno, usporedbom uzoraka koji sadrže sušene listove šećerne repe (LUDI i LUDW) s uzorcima koji sadrže svježe listove šećerne repe (LUWI i LUWW), može se utvrditi da uzorci pripremljeni sa sušenim listovima uglavnom imaju više srednje vrijednosti temperature, snage, energije, ukupne promjene energije i gustoće snage. Veći porast temperature kod uzoraka pripremljenih sa sušenim listovima, može biti posljedica manjeg toplinskog kapaciteta sušenih listova ( $1,2003 \text{ J g}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ ) u odnosu na svježe ( $3,2816 \text{ J g}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ ). Općenito, tijekom tretmana ultrazvukom, temperatura sustava povećava se kao funkcija primijenjene ultrazvučne snage, odnosno amplitude. Poznato je da kod primjene ultrazvuka, ultrazvučni generatori pretvaraju električnu energiju u mehaničku energiju, koja se zatim pretvara u akustičnu energiju u obliku ultrazvučnih valova koji se šire kroz tekući medij uz posljedičnu pojavu kavitacije. Implozija kavitacijskih mjehurića nastalih unutar tekućine, rezultira oslobađanjem toplinske energije – istovremeno, medij apsorbira oslobođenu toplinu što dovodi do povećanja temperature u sustavu (Merouani i sur., 2014).

## 4.2. REZULTATI PARAMETARA MJERENIH NAKON PROVEDENIH EKSTRAKCIJA

### 4.2.1. Rezultati ispitivanih svojstava nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

**Tablica 9.** Rezultati mjerenja ukupnih proteina i polifenola, pH vrijednosti i električne vodljivosti za uzorak LUDI

UZORAK	<i>t</i> [min]	A [%]	pH	G [mS cm <sup>-1</sup> ]	UP* [mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup> ]	UF* [mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup> ]
LUDI1	6	75	7,064	4,606	87,4829 ± 2,58	15,5487 ± 0,38
LUDI2	3	75	7,006	4,753	92,0399 ± 21,35	14,2413 ± 0,21
LUDI3	6	50	6,983	4,570	66,7228 ± 4,56	12,8165 ± 0,42
LUDI4	9	50	6,979	4,671	78,7335 ± 5,35	14,7845 ± 0,14
LUDI5	9	75	7,059	4,098	102,8166 ± 13,39	13,9491 ± 0,21
LUDI6	9	100	7,116	4,526	107,1954 ± 9,23	16,4695 ± 0,10
LUDI7	3	50	6,984	4,656	76,7303 ± 0,78	13,4764 ± 0,10
LUDI8	6	100	7,081	4,339	79,4462 ± 1,16	16,1279 ± 0,24
LUDI9	3	100	7,057	4,450	82,9609 ± 1,68	15,5686 ± 0,76

\* rezultati izraženi kao srednja vrijednost dviju paralela ± standardna devijacija, udio suhe tvari uzorka je 94,49 % *t*-vrijeme tretiranja; A-amplituda; G-električna vodljivost; UP-ukupni proteini; UF-ukupni fenoli

U tablici 9 prikazani su rezultati mjerenja pH vrijednosti, električne vodljivosti i masenog udjela ukupnih proteina i fenola uzorka LUDI nakon provedene UAE. Izmjerene pH vrijednosti nakon ekstrakcije kreću se u rasponu od 6,979 do 7,116; pH vrijednost uzorka LUDI prije tretmana iznosi 6,707. Električna vodljivost uzorka LUDI prije tretmana iznosi  $5,160 \text{ mS cm}^{-1}$ , a nakon tretmana od  $4,098$  do  $4,753 \text{ mS cm}^{-1}$ . Maseni udio ukupnih proteina izražen s obzirom na suhu tvar listova šećerne repe obuhvaća vrijednosti u rasponu od  $66,7228 \pm 4,56$  do  $107,1954 \pm 9,23 \text{ mg (g}_{s.tv.})^{-1}$ , dok je maseni udio polifenola u rasponu od  $12,8165 \pm 0,42$  do  $16,4695 \pm 0,10 \text{ mg (g}_{s.tv.})^{-1}$ . Općenito je udio ukupnih proteina u uzorcima veći od udjela fenola, što je i očekivano. Najviše vrijednosti ukupnih proteina i fenola postižu se kod uzorka LUDI6 koji ujedno podliježe najdužem vremenu tretiranja (9 min) i najvećoj amplitudi ultrazvuka (100 %), dok se najniže vrijednosti ukupnih proteina i fenola postižu kod uzorka LUDI3, nakon kojeg slijedi LUDI7 s najkraćim vremenom tretiranja (3 min) i najmanjom amplitudom (50 %). Općenito, niže vrijednosti fenola mogu biti rezultat lošeg odabira otapala ili netopivosti svih vrsta fenolnih spojeva u određenom otapalu – u biljnim tkivima, fenoli tvore komplekse s ugljikohidratima, proteinima i drugim biljnim komponentama pa neki fenoli velike molekulske mase i njihovi kompleksi mogu biti prilično netopivi u odabranom otapalu (Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Također, istraživanja su pokazala da voda kao ekstrakcijsko otapalo, bez dodatka drugih otapala (ugl. etanol), rezultira manjim prinosom ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima (Nzekoue i sur., 2020; Pradal i sur., 2016).



**Tablica 10.** Rezultati mjerenja ukupnih proteina i polifenola, pH vrijednosti i električne vodljivosti za uzorak LUDW

UZORAK	<i>t</i> [min]	A [%]	pH	G [mS cm <sup>-1</sup> ]	UP* [mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup> ]	UF* [mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup> ]
LUDW1	6	75	7,001	4,623	88,4837 ± 5,87	16,3085 ± 0,21
LUDW2	3	75	7,005	4,589	76,5644 ± 4,41	13,7985 ± 0,21
LUDW3	6	50	7,024	4,484	81,4229 ± 6,39	14,1852 ± 0,35
LUDW4	9	50	7,045	4,282	77,0927 ± 0,26	13,3525 ± 0,21
LUDW5	9	75	7,049	4,694	85,7070 ± 13,13	17,5053 ± 0,17
LUDW6	9	100	7,095	4,305	96,6261 ± 1,31	17,8924 ± 0,38
LUDW7	3	50	6,971	4,614	72,3163 ± 1,05	13,6970 ± 0,69
LUDW8	6	100	7,123	4,406	92,0755 ± 0,52	16,4009 ± 0,14
LUDW9	3	100	7,055	3,905	79,2545 ± 1,16	16,0583 ± 0,35

\* rezultati izraženi kao srednja vrijednost dviju paralela ± standardna devijacija, udio suhe tvari uzorka je 94,49 %

Rezultati mjerenja pH vrijednosti (tablica 10) nakon provedene UAE za uzorak LUDW kreću se u rasponu od 6,971 do 7,123. Izmjerena pH vrijednost i električna vodljivost netretiranog uzorka LUDW iznosi 6,670 i 5,004 mS cm<sup>-1</sup>. Električna vodljivost uzorka LUDW nakon ekstrakcije obuhvaća vrijednosti od 3,905-4,694 mS cm<sup>-1</sup>, koje su generalno nešto niže u usporedbi s uzorkom LUDI. Maseni udio ukupnih proteina obuhvaća vrijednosti u rasponu od 72,3163 ± 1,05 do 96,6261 ± 1,31 mg (g<sub>s.tv.</sub>)<sup>-1</sup>, dok je maseni udio polifenola veći s obzirom na uzorak LUDI, a iznosi od 13,3525 ± 0,21 do 17,8924 ± 0,38 mg (g<sub>s.tv.</sub>)<sup>-1</sup>. Najviše vrijednosti ukupnih proteina i fenola postižu se kod uzorka LUDW6 s najintenzivnijim ekstrakcijskim tretmanom (9 min uz amplitudu 100 %), dok se najniže vrijednosti ukupnih fenola postižu kod uzorka LUDI4, a najniži udio ukupnih proteina kod uzorka LUDI7 s najkraćim vremenom tretiranja (3 min) i najmanjom amplitudom (50 %).

**Tablica 11.** Rezultati mjerenja ukupnih proteina i polifenola, pH vrijednosti i električne vodljivosti za uzorak LUWI

UZORAK	<i>t</i> [min]	A [%]	pH	G [mS cm <sup>-1</sup> ]	UP* [mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup> ]	UF* [mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup> ]
LUWI1	6	75	7,065	0,872	111,0221 ± 0,00	9,3986 ± 0,14
LUWI2	3	75	7,151	0,751	66,5398 ± 5,81	6,4454 ± 0,00
LUWI3	6	50	7,071	0,749	55,3576 ± 0,00	5,2240 ± 0,14
LUWI4	9	50	7,102	0,777	68,4553 ± 1,59	6,8859 ± 0,28
LUWI5	9	75	7,104	0,934	117,4098 ± 1,07	13,4939 ± 0,71
LUWI6	9	100	7,067	0,968	126,4553 ± 3,20	14,7566 ± 0,00
LUWI7	3	50	7,157	0,658	43,5669 ± 0,27	4,2919 ± 0,28
LUWI8	6	100	7,072	0,914	119,4351 ± 0,53	14,5820 ± 0,42
LUWI9	3	100	7,244	0,825	88,8324 ± 3,72	10,3008 ± 0,28

\* rezultati izraženi kao srednja vrijednost dviju paralela ± standardna devijacija, udio suhe tvari uzorka je 22,97 %

Za uzorak LUWI, pH vrijednost prije tretmana je 7,556; a nakon tretmana vrijednosti iznose od 7,065 do 7,244 (tablica 11). Električna vodljivost uzoraka nakon UAE kreće se od 0,658 do 0,968 mS cm<sup>-1</sup> i puno je manja u usporedbi s uzorcima LUDI i LUDW. Prije tretmana električna vodljivost uzorka LUWI iznosila je 0,525 mS cm<sup>-1</sup>. Manje vrijednosti električne vodljivosti mogu biti posljedica korištenja svježih listova za pripremu uzoraka LUWI. Maseni udio ukupnih proteina uzorka LUWI obuhvaća vrijednosti u rasponu od 43,5669 ± 0,27 do 126,4553 ± 3,20 mg (g<sub>s.tv.</sub>)<sup>-1</sup> pri čemu se vrijednosti pojedinih uzoraka (LUWI1-9) međusobno podosta razlikuju, dok kod uzoraka sa sušenim listovima (LUDI1-9, LUDW1-9) razlika između rezultata nije toliko velika. Maseni udio ukupnih fenola je u rasponu od 4,2919 ± 0,28 do 14,7566 ± 0,00 mg (g<sub>s.tv.</sub>)<sup>-1</sup> i također je skokovit s obzirom na uzorke (LUWI1-9). Najviše vrijednosti ukupnih proteina i fenola postižu se kod uzorka LUWI6 koji je ekstrahiran uz najduže vrijeme tretiranja (9 min) i najveću amplitudu (100 %), dok se najniže vrijednosti ukupnih proteina i fenola postižu kod uzorka LUWI7 s najkraćim vremenom tretiranja (3 min) i najmanjom amplitudom (50 %). S povećanjem ultrazvučne snage, odnosno amplitude ultrazvuka koji putuje kroz otapalo, povećava se i prinos – što je veća ulazna snaga, to će implozija kavitacijskih mjehurića biti snažnija i uzorkovati veći prinos ekstrakcije. S druge strane, prevelika snaga ultrazvuka može povećati broj mjehurića u

otapalu, a time smanjiti učinkovitost ultrazvučne energije koja se prenosi u medij i posljedično smanjiti prinos (Chemat i sur., 2017).

**Tablica 12.** Rezultati mjerenja ukupnih proteina i polifenola, pH vrijednosti i električne vodljivosti za uzorak LUWW

UZORAK	<i>t</i> [min]	A [%]	pH	<i>G</i> [mS cm <sup>-1</sup> ]	UP* [mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup> ]	UF* [mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup> ]
LUWW1	6	75	7,282	0,906	111,2209 ± 1,38	10,7022 ± 0,85
LUWW2	3	75	7,272	0,795	77,4795 ± 0,76	7,4719 ± 0,00
LUWW3	6	50	7,249	0,814	67,6761 ± 2,59	6,2829 ± 0,00
LUWW4	9	50	7,271	0,829	77,4666 ± 1,30	7,2059 ± 0,14
LUWW5	9	75	7,260	0,961	142,8729 ± 4,80	14,3606 ± 0,99
LUWW6	9	100	7,197	1,037	147,9095 ± 4,58	16,0969 ± 0,00
LUWW7	3	50	7,265	0,757	54,5248 ± 3,77	6,2279 ± 0,14
LUWW8	6	100	7,169	1,040	145,4504 ± 0,00	13,8995 ± 0,71
LUWW9	3	100	7,260	0,881	97,0568 ± 1,07	12,5060 ± 1,13

\* rezultati izraženi kao srednja vrijednost dviju paralela ± standardna devijacija, udio suhe tvari uzorka je 22,97 %

Uzorak LUWW nakon UAE ima pH vrijednosti koje se kreću od 7,169 do 7,282 (netretirani uzorak ima pH 8,406) i električnu vodljivost koja se kreće u rasponu od 0,757 do 1,040 mS cm<sup>-1</sup> (netretirani uzorak ima  $G = 1,596$  mS cm<sup>-1</sup>) te slijedi logiku uzorka LUWI. Maseni udio ukupnih proteina uzorka LUWW iznosi od  $54,5248 \pm 3,77$  do  $147,9095 \pm 4,58$  mg (g<sub>s.tv.</sub>)<sup>-1</sup>, a maseni udio ukupnih fenola od  $6,2279 \pm 0,14$  do  $16,0969 \pm 0,00$  mg (g<sub>s.tv.</sub>)<sup>-1</sup> (tablica 12). Razlike u vrijednostima ukupnih proteina i ukupnih fenola između uzoraka LUWW1-9, skokovite su kao i kod uzorka LUWI. Najviše vrijednosti ukupnih proteina i fenola postižu se kod najintenzivnije tretiranog uzorka (LUWW6), dok se najniže vrijednosti postižu kod uzorka s najblažim tretmanom (LUWI7).

#### 4.2.2. Rezultati ispitivanih svojstava nakon toplinske ekstrakcije

**Tablica 13.** Rezultati mjerenja ukupnih proteina i polifenola, pH vrijednosti i električne vodljivosti za uzorak LDO

UZORAK	$t$ [min]	pH	$G$ [mS cm <sup>-1</sup> ]	UP* [mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup> ]	UF* [mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup> ]
LDO/3	3	6,870	5,113	74,1168 ± 2,21	14,0949 ± 0,21
LDO/6	6	6,898	5,073	73,9274 ± 2,73	13,9029 ± 0,14
LDO/9	9	6,880	4,104	65,4965 ± 1,42	11,8435 ± 0,14

\* rezultati izraženi kao srednja vrijednost dviju paralela ± standardna devijacija, udio suhe tvari uzorka je 94,49 %

U tablici 13 prikazano je vrijeme trajanja tretmana u te rezultati mjerenja pH vrijednosti, električne vodljivosti i masenog udjela ukupnih proteina i fenola uzorka LDO nakon provedene toplinske ekstrakcije. Izmjerene pH vrijednosti i električna vodljivost neovisni su o vremenu tretiranja. Vrijednosti ukupnih proteina izražene s obzirom na suhu tvar listova šećerne repe, kao i maseni udio fenola, opadaju s porastom vremena tretiranja. Najviše vrijednosti ukupnih proteina ( $74,1168 \pm 2,21$  mg (g<sub>s.tv.</sub>)<sup>-1</sup>) i fenola ( $14,0949 \pm 0,21$  mg (g<sub>s.tv.</sub>)<sup>-1</sup>) postižu se kod uzorka LDO/3 tretiranog 3 minute. Izmjerena pH vrijednost i električna vodljivost netretiranog uzorka LDO iznosi 6,707 i 5,160 mS cm<sup>-1</sup>.

**Tablica 14.** Rezultati mjerenja ukupnih proteina i polifenola, pH vrijednosti i električne vodljivosti za uzorak LWO

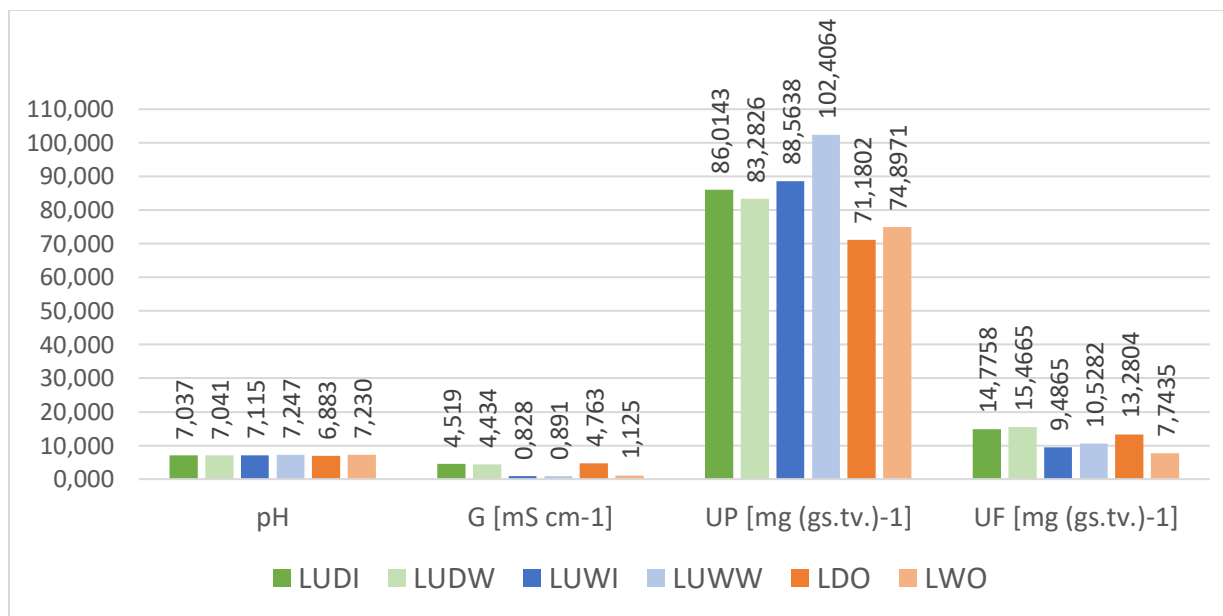
UZORAK	$t$ [min]	pH	$G$ [mS cm <sup>-1</sup> ]	UP* [mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup> ]	UF* [mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup> ]
LWO/3	3	7,221	1,125	73,2943 ± 0,31	7,1368 ± 0,00
LWO/6	6	7,237	1,114	73,8450 ± 1,07	6,9954 ± 0,14
LWO/9	9	7,232	1,135	77,5520 ± 0,54	9,0984 ± 0,28

\* rezultati izraženi kao srednja vrijednost dviju paralela ± standardna devijacija, udio suhe tvari uzorka je 22,97 %

Uzorci LWO (tablica 14) ne pokazuju korelaciju između vremena tretiranja i dobivenih vrijednosti ukupnih proteina i fenola kao što je slučaj kod uzorka LDO. Najviše vrijednosti ukupnih proteina ( $77,5520 \pm 0,54$  mg (g<sub>s.tv.</sub>)<sup>-1</sup>) i fenola ( $9,0984 \pm 0,28$  mg (g<sub>s.tv.</sub>)<sup>-1</sup>) postižu se kod

uzorka LWO/9 tretiranog 9 minuta. Izmjerena pH vrijednost i električna vodljivost netretiranog uzorka LDO iznosi 7,556 i 0,525 mS cm<sup>-1</sup>.

#### 4.2.3. Usporedba rezultata ispitivanih svojstava dobivenih nakon provedenih ekstrakcija



\* Za izradu dijagrama korištene su srednje vrijednosti rezultata iz tablica 9-14.

**Slika 6.** Grafički prikaz rezultata ispitivanih svojstava (pH, G-električna vodljivost; UP-ukupni proteini; UF-ukupni fenoli) uzoraka tretiranih ultrazvučnom ekstrakcijom (LUDI, LUDW, LUWI i LUWW) i toplinskom tehnikom ekstrakcije (LDO i LWO)

Iz grafičkog prikaza (slika 6) može se zaključiti sljedeće:

- i. pH vrijednost generalno je viša kod uzoraka kojima je dodano hladno ekstrakcijsko otapalo (LUDW i LUWW), ali i kod uzoraka gdje su za pripremu korišteni svježiji listovi šećerne repe (LUWI, LUWW i LWO) u odnosu na uzorke pripremljene sa sušenim listovima (LUDI, LUDW i LDO). pH vrijednosti izmjerene prije provedbe ekstrakcije kod uzoraka sa sušenim listovima manje su u odnosu na pH izmjeren nakon tretmana ultrazvukom. S druge strane, kod uzoraka sa svježim listovima pH prije tretmana viši je od onog izmjerenog nakon ekstrakcije. Tijekom tretmana ultrazvukom dolazi do narušavanja strukture stanične membrane i razaranja određenog broja stanica, što rezultira otpuštanjem elektrolita u otopinu, uslijed čega se pH vrijednost nakon tretmana mijenja u odnosu na pH vrijednost netretiranog uzorka. Uz to, narušavanje stanične strukture – stvaranje pora na

membrani; ovisi o čvrstoći površinske strukture stanica, stoga se razlika u promjenama pH vrijednosti nakon tretmana javlja obzirom na suhi ili svježi oblik lista korišten za pripremu uzorka. Disrupcija bioloških membrana javlja se kao posljedica kombiniranog djelovanja kavitacije i nastalog smicanja, zagrijavanja medija i stvaranja slobodnih radikala, a kada se radi o vodenom mediju, tretmanom UAE dolazi do stvaranja  $H\bullet$  i  $\bullet OH$  radikala ( $H_2O \rightarrow H\bullet + \bullet OH$ ), koji onda dodatno utječu na promjene pH vrijednosti (Vikulin i Vikulina, 2020).

- ii. Vrijednosti električne vodljivosti vidljivo su više kod uzoraka pripremljenih sa sušenim listovima (LUDI, LUDW i LDO). Generalno, uzorci podvrgnuti toplinskoj ekstrakciji imaju veću električnu vodljivost od uzoraka tretiranih UAE. Električna vodljivost izmjerena prije provedbe ekstrakcije kod uzoraka sa sušenim listovima veća je u odnosu na provodljivost izmjerenu nakon tretmana ultrazvukom; kod uzoraka sa svježim listovima, s iznimkom uzorka LUWW, električna vodljivost nakon tretmana viša je od one izmjerene nakon ekstrakcije. Povećanje električne vodljivosti određenih uzoraka moguće je zbog oslobađanja čestica s površine ultrazvučne sonde, uzrokovanog oštećenjem vrha sonde zbog utjecaja kavitacije.
- iii. Uzorci pripremljeni sa svježim listovima šećerne repe (LUWI, LUWW i LWO) pokazuju veći udio ukupnih proteina u odnosu na uzorke pripremljene sa sušenim listovima (LUDI, LUDW i LDO). Sušenje, kao metoda konzerviranja listova, ometa ekstrakciju proteina, dok se hlađenje i zamrzavanje (način konzerviranja korišten kod svježih listova šećerne repe) smatraju najprikladnijim metodama stabilizacije proteina u listovima (Tamayo Tenorio i sur., 2017). Uzorci podvrgnuti UAE imaju veći udio ukupnih proteina, nego uzorci tretirani toplinskim tretmanom. Nema direktne korelacije između temperature korištenog ekstrakcijskog otapala i ukupnog prinosa proteina.
- iv. Maseni udio ukupnih fenola, puno je manji od masenog udjela ukupnih proteina – kod uzoraka pripremljenih sa svježim listovima udio ukupnih fenola je oko 9 puta manji od ukupnih proteina, dok je kod uzoraka pripremljenih sa sušenim listovima udio ukupnih fenola 5-6 puta manji od udjela ukupnih proteina. Kod uzoraka kojima je dodano hladno ekstrakcijsko otapalo (LUDW i LUWW), udio ukupnih fenola generalno je veći u usporedbi s uzorcima gdje je dodana deionizirana voda sobe temperature (LUDI i LUWI). Također, uzorci sa sušenim listovima šećerne repe (LUDI, LUDW i LDO) imaju veći

maseni udio fenola od uzoraka sa svježim listovima – među uzorcima sa sušenim listovima, oni tretirani UAE (LUDI i LUDW) pokazuju veći prinos od uzorka tretiranog toplinskom metodom ekstrakcije (LDO); istovremeno kod uzorka LDO postiže se veći udio fenola nego kod uzoraka sa svježim listovima tretiranih UAE (LUWI i LUWW). Općenito, veća učinkovitost UAE, u smislu prinosa fenolnih spojeva i sastava ekstrakata, može se postići smanjenjem udjela vlage u uzorku kako bi se poboljšao kontakt otapala i krutine (Chemat i sur., 2017), ali i smanjenjem veličine čestica. Zaključno, kod ekstrakcije ukupnih fenola iz listova šećerne repe temperatura i primijenjena metoda imaju manji utjecaj od udjela vlage u listovima (sušeni, odnosno svježi). Međutim, porast temperature u sustavu tijekom ekstrakcije ne može se zanemariti – kada se ultrazvuk koristi kao tehnologija ekstrakcije, porast topline medija može uzorkovati povećanje prinosa, ubrzavanjem i maksimiziranjem ekstrakcije polifenola (Nutter i sur., 2021) promjenama u strukturi membrane biljnih stanica, olakšanom difuzijom ekstrahiranih molekula u otapalo i povećanjem topljivost polifenola; ili može imati negativan učinak ukoliko se tijekom procesa dostignu temperature kod kojih dolazi do dezintegracije ciljanih spojeva.

Tamayo Tenorio i sur. (2016) u svom istraživanju navode da je udio proteina listova šećerne repe s obzirom na suhu tvar  $15,5 \pm 1,7$  %, dobiven toplinskom metodom ekstrakcije uz centrifugiranje. U drugim studijama, zabilježen je veći udio proteina ( $\approx 23$ - $24$  %) (Akyüz i Ersus, 2021; Lammens i sur., 2012), a razlika u rezultatima može se objasniti korištenjem drugačijih metoda obrade listova (ekstrakcija potpomognuta enzimima) ili kvantitativnih metoda za određivanje ukupnih proteina (Bradford metoda). Osim toga, kod listova šećerne repe pokazalo se da količina ekstrahiranih proteina ovisi o uvjetima rasta, ali i sorti šećerne repe (Kiskini i sur., 2016). U svom istraživanju, Kiskini i sur. (2016) navode prosječan udio proteina od  $9,6 \pm 2,5$  % (s obzirom na s.tv.) kod listova šećerne repe uzgojene u stakleniku te udio proteina u rasponu od  $14,6 \pm 1,0$  do  $22,8 \pm 1,7$  % kod listova šećerne repe uzgojene na polju. Obzirom na navedena istraživanja, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom postiže nezadovoljavajuće rezultate s maksimalnim udjelom ukupnih proteina od  $14,7910$  % ( $147,9095 \pm 4,58$  mg (g<sub>s.tv.</sub>)<sup>-1</sup>) koji je konkretno postignut kod uzorka LUWW6 i s najvećom prosječnom vrijednosti od  $10,2406$  % (slika 6). Kiskini i sur. u svojem istraživanju također navode i udio fenolnih spojeva u rasponu od  $1,0 \pm 0,1$  do  $2,7 \pm 0,1$  % kod listova šećerne repe uzgojene na polju. Istovremeno, maksimalni udio ukupnih fenola dobiven UAE iznosi  $1,7892$  % ( $17,8924 \pm 0,38$  mg (g<sub>s.tv.</sub>)<sup>-1</sup>) za uzorak LUDW6,

dok najveća prosječna vrijednost ukupnih fenola prema slici 6 iznosi 1,5467 % (15,4665 mg (g<sub>s.tv.</sub>)<sup>-1</sup>).

Općenito, nedostatak provedenih istraživanja slične problematike, čini rezultate dobivene ultrazvučnom ekstrakcijom proteina i polifenola iz listova šećerne repe neusporedivima s ranije objavljenim podacima. Također, u literaturi postoji oskudan broj istraživanja povezanih s optimizacijom parametara ekstrakcije proteina i polifenola iz zelenih listova, dok istovremeno nema dostupnih studija o optimizaciji ultrazvučne ekstrakcije proteina i polifenola iz listova šećerne repe.

### 4.3. REZULTATI ODREĐIVANJA SUHE TVARI SUŠENJEM DO KONSTANTNE MASE

**Tablica 15.** Rezultati odvaga i izračuna dobiveni određivanjem suhe tvari uzoraka lista šećerne repe

UZORAK	$m_0$ [g]	$m_1$ [g]	$m_2$ [g]	SUHA TVAR [%]*
suhi list	37,1782	39,6784	39,5407	94,4924
svježi list	27,617	30,0439	28,1745	22,9717

\* izračun prema jednadžbi [4]

$m_0$ -masa prazne posudice;  $m_1$ -masa posudice s uzorkom prije sušenja;  $m_2$ -masa posudice s uzorkom nakon sušenja

### 4.4. REZULTATI STATISTIČKE OBRADJE PODATAKA EKSTRAKCIJE POTPOMOŽNUTE ULTRAZVUKOM

#### 4.4.1. Rezultati statističke obrade i optimiranja parametara za uzorak LUDI

##### 4.4.1.1. Statistička analiza eksperimenta – ukupni proteini

Iz grafičkog prikaza u prilogu 1, vidljivo je da na ukupne proteine uzorka LUDI utječu ulazni parametri (amplituda i vrijeme tretiranja), ali i njihove interakcije – interakcija amplitude i vremena tretiranja, kvadratna interakcija amplitude te kvadratna interakcija vremena tretiranja. U prilogu 5, dane su tablice analize varijanci za uzorak LUDI. Analiza varijanci dijeli varijabilnost udjela ukupnih proteina, ukupnih fenola, pH, električne vodljivosti i ukupne promjene energije za svaki od učinaka. Kako bi se testirala statistička značajnost svakog parametra, srednja vrijednost



kvadrata uspoređuje se s procjenom eksperimentalne pogreške. Statistička analiza UAE provedena je uključujući F-omjer koji utvrđuje je li varijabilnost između skupinama veća od varijabilnosti unutar skupina. Također, pomoću F-omjera utvrđena je sveukupna značajnost ugrađenog modela i koeficijent determinacije  $R^2$ . Rezultati analize varijanci za udio ukupnih proteina uzorka LUDI (prilog 5) pokazuju da oba ulazna parametra (amplituda i vrijeme tretiranja), interakcija amplitude i vremena tretiranja, kvadratna interakcija amplitude te kvadratna interakcija vremena tretiranja imaju značajan utjecaj na udio ukupnih proteina budući da su im p-vrijednosti manje od 0,05; što ukazuje da se značajno razlikuju od nule na razini pouzdanosti od 95,0 %. P-vrijednost se koristi za provjeru značaja svakog koeficijenta – što je p-vrijednost manja, to je veći značaj odgovarajućeg koeficijenta.  $R^2$  pokazuje varijabilnost ukupnih proteina od 99,0017 %.  $R^2$  prilagođen za stupnjeve slobode, prikladniji za usporedbu modela s različitim brojem nezavisnih varijabli, iznosi 97,3378 %.

Dijagram odzivne površine za udio ukupnih proteina uzorka LUDI (prilog 9) pokazuje statistički značajan utjecaj amplitude i vremena tretiranja na ukupne proteine. Duljim trajanjem tretmana, udio ekstrahiranih proteina se povećava. Izradom i očitavanjem dijagrama odzivne površine, omogućeno je zapažanje drugačijeg odgovora izazvanog promjenama eksperimentalnih faktora, ali i korekcija pojedinih faktora u budućim istraživanjima.

Jednadžba regresije za ukupne proteine uzorka LUDI (prilog 13) opisuje kako se ponaša polinom dobiven iz obrađenih rezultata, zavisno o vrijednostima amplitude i vremena tretiranja – promjenom jedne varijable, mijenja se rezultat jednadžbe (vrijednost udjela ukupnih proteina) pa se prilikom dizajniranja eksperimenta mogu predvidjeti okvirne izlazne vrijednosti proteina, što olakšava korigiranje eksperimentalnih parametara ovisno o željenim prinosima ekstrakcije.

Rezultati optimizacije uzorka LUDI (prilog 14) daju optimalne vrijednosti amplitude (88,8589 %) i vremena tretiranja (9 min) koji se mogu primijeniti prilikom UAE za postizanje maksimalnih vrijednosti ukupnih proteina. Optimalna vrijednost udjela ukupnih proteina za uzorak LUDI iznosi 108,076 mg (g<sub>s.tv.</sub>)<sup>-1</sup>. Prilikom manipulacije UAE, treba uzeti u obzir statističku značajnost oba ulazna parametra. Odabirom optimalnih uvjeta amplitude, izbjegava se neželjena razgradnja ekstrahiranih spojeva (Tiwari, 2015).

#### *4.4.1.2. Statistička analiza eksperimenta – ukupni fenolni spojevi*

Na udio ukupnih fenola uzorka LUDI (prilog 1) ne utječu ulazni parametri niti njihove interakcije – interakcija amplitude i vremena tretiranja, kvadratna interakcija amplitude te kvadratna interakcija vremena tretiranja. Najbliže statističkoj značajnosti je utjecaj amplitude. Rezultati analize varijanci za udio ukupnih fenola uzorka LUDI (prilog 5) pokazuju da ulazni parametri (amplituda i vrijeme tretiranja), kao i njihove interakcije, nemaju statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola budući da su im p-vrijednosti veće od 0,05.

Dijagram odzivne površine za udio ukupnih fenola uzorka LUDI (prilog 9) pokazuje da duljim trajanjem tretmana, udio ekstrahiranih fenola uglavnom ostaje isti. Međutim, povećanjem amplitude vidljiv je i porast udjela ukupnih fenola. Jednadžba regresije za ukupne fenole uzorka LUDI (prilog 13) opisuje kako se ponaša polinom dobiven iz obrađenih rezultata, zavisno o vrijednostima amplitude i vremena tretiranja.

Za postizanje maksimalnih vrijednosti ukupnih proteina iz listova šećerne repe tretmanom UAE, rezultati optimizacije uzorka LUDI (prilog 14) ukazuju da je optimalna amplituda od 100 % i optimalno vrijeme tretiranja u trajanju od 9 minuta. Optimalna vrijednost udjela ukupnih fenola za uzorak LUDI iznosi  $16,2454 \text{ mg (g}_{s.tv.})^{-1}$ . Prilikom manipulacije UAE treba uzeti u obzir da ulazni parametri ne pokazuju statističku značajnost, no da istovremeno utjecaj amplitude ipak pokazuje određeni značaj za konačan prinos fenola.

#### *4.4.1.3. Statistička analiza eksperimenta – pH vrijednost*

Očitanjem Pareto dijagrama (prilog 1) vidljivo je da na pH vrijednost uzorka LUDI utječe ulazna vrijednost amplitude. Vrijeme tretiranja, interakcija amplitude i vremena tretiranja te kvadratne interakcije nemaju statistički značajan utjecaj na izlazne pH vrijednosti uzorka. MANOVA izrađena za pH uzorka LUDI (prilog 5) pokazuje da amplituda ima značajan utjecaj na pH, s obzirom na p-vrijednost manju od 0,05 na razini pouzdanosti od 95,0%. Ostali parametri nemaju statistički značajan utjecaj na pH ( $p > 0,05$ ).

Dijagram odzivne površine za pH uzorka LUDI (prilog 9) pokazuje statistički značajan utjecaj amplitude na izlazne vrijednosti. Duljim trajanjem tretmana pri nižim amplitudama, pH uglavnom ostaje isti. Jednadžba regresije za pH uzorka LUDI (prilog 13) opisuje ponašanje polinoma dobivenog iz obrađenih rezultata, zavisno o vrijednostima amplitude i vremena tretiranja.

Za postizanje maksimalne pH vrijednosti, rezultati optimizacije uzorka LUDI (prilog 14) ukazuju da su amplituda od 100 % i vrijeme tretiranja u trajanju od 9 minuta optimalne vrijednosti za UAE. Optimalna pH vrijednost za uzorak LUDI iznosi 7,11544. Kod eksperimentalnog dizajna UAE treba uzeti u obzir da je utjecaj amplitude statistički značajan za konačan pH uzorka.

#### *4.4.1.4. Statistička analiza eksperimenta – električna vodljivost*

Na električnu vodljivost uzorka LUDI (prilog 1) ne utječu ulazni parametri niti njihove interakcije – interakcija amplitude i vremena tretiranja, kvadratne interakcije. MANOVA rezultati za električnu vodljivost uzorka LUDI iz tablice u prilogu 5, pokazuju da amplituda i vrijeme tretiranja, kao i njihove interakcije, nemaju statistički značajan utjecaj na električnu vodljivost uzorka budući da su im p-vrijednosti veće od 0,05.

Dijagram odzivne površine uzorka LUDI ukazuje da se električna vodljivost smanjuje s porastom amplitude i duljim trajanjem tretmana. Međutim, ulazni parametri nisu statistički značajni. Jednadžba regresije za električnu vodljivost uzorka LUDI (prilog 13) opisuje kako se ponaša polinom dobiven iz obrađenih rezultata, zavisno o ulaznim vrijednostima amplitude i vremena tretiranja.

Rezultati optimizacije dani u prilogu 14, daju optimalnu vrijednost amplitude (50 %) i vrijeme tretiranja (3 min) za postizanje maksimalne električne vodljivosti uzorka LUDI koja iznosi 4,74847 mS cm<sup>-1</sup>.

#### *4.4.1.5. Statistička analiza eksperimenta – ukupna promjena energije*

Na ukupnu promjenu energije uzorka LUDI (prilog 1) ne utječu ulazni parametri niti njihove interakcije – interakcija amplitude i vremena tretiranja, kvadratne interakcije. MANOVA rezultati za ukupnu promjenu energije uzorka LUDI (prilog 5) pokazuju da amplituda i vrijeme tretiranja, kao i njihove interakcije, nemaju statistički značajan utjecaj na električnu vodljivost uzorka ( $p > 0,05$ ).

Dijagram odzivne površine za ukupnu promjenu energije uzorka LUDI koji se nalazi u prilogu 9, pokazuje promjene izlaznih vrijednosti s obzirom na amplitudu i vrijeme tretiranja. Vrijednosti ukupne promjene energije najveće su kod najmanje amplitude (50 %). Obzirom na vrijeme trajanja tretmana, najniže vrijednosti se uglavnom postižu kod najkraćeg (3 min) i najduljeg (9 min)

tretmana. Pri tom, niti jedan od ulaznih parametara nema statistički značajan utjecaj na ukupnu promjenu energije uzorka LUDI. Jednadžba regresije za ukupnu promjenu energije uzorka LUDI nalazi se u prilogu 13.

Za postizanje maksimalne izlazne vrijednosti ukupne promjene energije, rezultati optimizacije (prilog 14) pokazuju da su amplituda od 50 % i vrijeme tretiranja u trajanju od 6 minuta optimalne vrijednosti ulaznih parametara. Optimalna vrijednost maksimalne ukupne promjene energije za uzorak LUDI iznosi 54,2522 W.

#### 4.4.2. Rezultati statističke obrade i optimiranja parametara za uzorak LUDW

##### 4.4.2.1. Statistička analiza eksperimenta – ukupni proteini

Na grafičkom prikazu u prilogu 2, vidljivo je da na ukupne proteine uzorka LUDW utječu ulazni parametri (amplituda i vrijeme tretiranja), interakcija amplitude i vremena tretiranja, kvadratna interakcija vremena tretiranja, ali ne i kvadratna interakcija amplitude. Rezultati analize varijanci uzorka LUDW (prilog 6) pokazuju da amplituda, vrijeme tretiranja, interakcija amplitude i vremena tretiranja te kvadratna interakcija vremena tretiranja imaju značajan utjecaj na udio ukupnih proteina, budući da su im p-vrijednosti manje od 0,05 na razini pouzdanosti od 95,0 %. Kvadratna interakcija amplitude nije statistički značajna ( $p > 0,05$ ).

Dijagram odzivne površine za udio ukupnih proteina uzorka LUDW (prilog 10) pokazuje statistički značajan utjecaj amplitude i vremena tretiranja na ukupne proteine. Povećanjem amplitude, udio ekstrahiranih proteina raste. Jednadžba regresije za ukupne proteine uzorka LUDW iz priloga 13, opisuje kako se ponaša polinom dobiven iz obrađenih rezultata, zavisno o vrijednostima amplitude i vremena tretiranja.

Rezultati optimizacije uzorka LUDW (prilog 15) daju optimalne vrijednosti amplitude (100 %) i vremena tretiranja (8 min) koji se mogu primijeniti prilikom UAE za postizanje maksimalnih vrijednosti ukupnih proteina. Optimalna vrijednost udjela ukupnih proteina za uzorak LUDW iznosi 96,246 mg ( $g_{s.tv.}$ )<sup>-1</sup>. Prilikom manipulacije UAE, treba uzeti u obzir statističku značajnost oba ulazna parametra.

#### 4.4.2.2. Statistička analiza eksperimenta – ukupni fenolni spojevi

Očitanjem drugog Pareto dijagrama iz priloga 2, vidljivo je da na vrijednost ukupnih fenola uzorka LUDW utječe ulazna vrijednost amplitude. Vrijeme tretiranja, interakcija amplitude i vremena tretiranja te kvadratne interakcije, nemaju statistički značajan utjecaj. MANOVA izrađena za ukupne fenole uzorka LUDW iz priloga 6, pokazuje da statistički značajan utjecaj ima samo amplituda ( $p < 0,05$ ). Ostali parametri nemaju statistički značajan utjecaj ( $p > 0,05$ ).

Dijagram odzivne površine za udio ukupnih fenola uzorka LUDW (prilog 10) pokazuje da duljim trajanjem tretmana i većom amplitudom, udio ekstrahiranih fenola uglavnom raste, pri čemu jedino amplituda ima statistički značajan utjecaj. Jednadžba regresije za ukupne fenole uzorka LUDW nalazi se u prilogu 13, a opisuje ponašanje polinoma ovisno o promjeni amplitude i vremena tretiranja.

Za postizanje maksimalnih vrijednosti udjela ukupnih fenola tretmanom UAE, rezultati optimizacije uzorka LUDW iz priloga 15, pokazuju da je optimalna amplituda od 100 % i optimalno vrijeme tretiranja u trajanju od 9 minuta. Optimalna vrijednost udjela ukupnih fenola za uzorak LUDW iznosi 18,112 mg ( $g_{s.iv.}$ )<sup>-1</sup>. Prilikom manipulacije UAE treba uzeti u obzir da utjecaj amplitude pokazuje statističku značajnost.

#### 4.4.2.3. Statistička analiza eksperimenta – pH vrijednost

Očitanjem Pareto dijagrama (prilog 2) vidljivo je da na pH vrijednost uzorka LUDW utječe samo ulazna vrijednost amplitude. Vrijeme tretiranja, interakcija amplitude i vremena tretiranja te kvadratne interakcije nemaju statistički značajan utjecaj na izlazne pH vrijednosti uzorka. MANOVA izrađena za pH uzorka LUDW (prilog 6) pokazuje da isključivo amplituda ima statistički značajan utjecaj, uz p-vrijednost manju od 0,05. Ostali parametri nemaju statistički značajan utjecaj na pH ( $p > 0,05$ ).

Dijagram odzivne površine za pH uzorka LUDW (prilog 10) pokazuje statistički značajan utjecaj amplitude na izlazne vrijednosti. Duljim trajanjem tretmana pri višim amplitudama, pH ostaje približno isti, dok kod nižih amplituda blago raste. Jednadžba regresije za pH uzorka LUDW (prilog 13) opisuje kako se ponaša polinom uslijed promjena vrijednosti amplitude i/ili vremena tretiranja.

Za postizanje maksimalnih pH vrijednosti, rezultati optimizacije uzorka LUDW iz priloga 15, ukazuju da su amplituda od 100 % i vrijeme tretiranja u trajanju od oko 8 minuta optimalne vrijednosti za UAE. Optimalna pH vrijednost za uzorak LUDW iznosi 7,10572. Kod eksperimentalnog dizajna UAE treba uzeti u obzir da je utjecaj amplitude statistički značajan za izlazni pH uzorka.

#### *4.4.2.4. Statistička analiza eksperimenta – električna vodljivost*

Pareto dijagram za električnu vodljivost uzorka LUDW (prilog 2) pokazuje statističku značajnost utjecaja kvadratne interakcije amplitude. Vidljiv je i veliki utjecaj interakcije amplitude i vremena tretiranja, no ipak nije statistički značajan za izlazne vrijednosti električne vodljivosti. MANOVA za električnu vodljivost uzorka LUDW (prilog 6) ukazuje da je jedino p-vrijednost kvadratne interakcije amplitude manja od 0,05; što ju čini statistički značajnim parametrom.

Na dijagramu odzivne površine uzorka LUDW (prilog 10) vidljiv je pad električne vodljivosti s porastom amplitude, ali i istovremeni rast provodljivosti s obzirom na produljenje vremena trajanja tretmana pri maksimalnoj amplitudi. Jednadžba regresije, odnosno polinom optimizacije za električnu vodljivost uzorka LUDW nalazi se u prilogu 13.

Rezultati optimizacije (prilog 15) daju optimalnu vrijednost amplitude od 69,2823 % i optimalno vrijeme trajanja tretmana od 5,8162 min, za postizanje maksimalne izlazne vrijednosti električne vodljivosti uzorka LUDW. Optimalna vrijednost električne vodljivosti za uzorak LUDW iznosi 4,7198 mS cm<sup>-1</sup>.

#### *4.4.2.5. Statistička analiza eksperimenta – ukupna promjena energije*

Na ukupnu promjenu energije uzorka LUDW, kao što je vidljivo na Pareto dijagramu iz priloga 2, statistički značajan utjecaj ima samo korištena amplituda ultrazvuka. Ostali parametri kao što su vrijeme tretiranja, interakcija amplitude i vremena tretiranja te kvadratne interakcije, nemaju statističku značajnost na izlazne vrijednosti. Analiza varijance za ukupnu promjenu energije uzorka LUDW (prilog 6) javlja statističku značajnost amplitude uz p-vrijednost manju od 0,05.

Iz dijagrama odzivne površine (prilog 10) može se vidjeti utjecaj amplitude na porast ukupne promjene energije, ali i utjecaj vremena trajanja tretmana koji također uzorkuje veću izlaznu ukupnu promjenu energije. Međutim, jedino amplituda ima statistički značajan utjecaj na izlazne

vrijednosti. Jednadžba regresije za ukupnu promjenu energije uzorka LUDW (prilog 13) opisuje kako se ponaša polinom dobiven iz obrađenih rezultata, zavisno o vrijednostima amplitude i vremena tretiranja.

Za postizanje maksimalne vrijednosti ukupne promjene energije, koja za uzorak LUDW iznosi 60,7233 W, potrebni su optimalni parametri – amplituda od 100% i vrijeme trajanja od 9 minuta (prilog 15).

#### 4.4.3. Rezultati statističke obrade i optimiranja parametara za uzorak LUWI

##### 4.4.3.1. Statistička analiza eksperimenta – ukupni proteini

Na grafičkom prikazu u prilogu 3, vidljivo je da na ukupne proteine uzorka LUWI statistički značajan utjecaj imaju ulazni parametri, amplituda i vrijeme tretiranja. Analiza varijance ukupnih proteina uzorka LUWI (prilog 7) javlja statističku značajnost ulaznih parametara amplitude i vremena tretiranja, uz p-vrijednosti manje od 0,05.

Na dijagramu odzivne površine (prilog 11) vidljiv je utjecaj porasta amplitude i vremena tretiranja na povećanje prinosa ukupnih proteina uzorka LUWI. Jednadžba regresije za ukupne proteine uzorka LUWI (prilog 13), pokazuje promjenu izlazne vrijednosti ukupnih proteina zavisno o ulaznim vrijednostima amplitude i vremena tretiranja.

Optimizacijom UAE uzorka LUWI (prilog 16) dobivene su optimalne ulazne vrijednosti amplitude (100 %) i vremena tretiranja (9 min) za maksimalnu izlaznu vrijednost ukupnih proteina. Optimalna vrijednost ukupnih proteina uzorka LUWI iznosi 130,301 mg (g<sub>s.tv.</sub>)<sup>-1</sup>.

##### 4.4.3.2. Statistička analiza eksperimenta – ukupni fenolni spojevi

Kod uzorka LUWI, na ukupne fenole, kao i kod proteina, statistički značajan utjecaj pokazuju samo ulazni parametri amplitude i vremena tretiranja UAE (prilog 3). MANOVA ukupnih fenola uzorka LUWI (prilog 7), pokazuje p-vrijednosti ulaznih parametara UAE, kvadratnih interakcija i interakcije ulaznih parametara, od kojih jedino p-vrijednosti amplitude i vremena tretiranja iznose manje od 0,05 i imaju statističku značajnost na udio fenola.

Na dijagramu odzivne površine (prilog 11) vidljiv je uglavnom pravilan porast udjela fenola s obzirom na povećanje amplitude ultrazvuka i dulje vrijeme trajanja UAE. Jednadžba regresije za

ukupne fenole uzorka LUWI (prilog 13) opisuje kako se ponaša polinom dobiven iz obrađenih rezultata, zavisno o vrijednostima amplitude i vremena tretiranja.

Optimalne vrijednosti amplitude i vremena tretiranja prilikom UAE uzorka LUWI za postizanje maksimalnog udjela ukupnih fenola iznose, kao što je prikazano u prilogu 16, 100 % i 9 min. Optimalna vrijednost ukupnih fenola u ovom slučaju iznosi  $15,9042 \text{ mg (g}_{s.iv.})^{-1}$ . Kod uzorka LUWI, optimalni parametri ulaznih varijabli jednaki su za postizanje maksimalnih rezultata ukupnih proteina i fenola.

#### *4.4.3.3. Statistička analiza eksperimenta – pH vrijednost*

Promatranjem Pareto dijagrama konstruiranog za pH uzorka LUWI (prilog 3), uočava se razlika u odnosu na prethodna dva dijagrama za isti uzorak. Statističku značajnost na pH vrijednost imaju samo vrijeme tretiranja i kvadratna interakcija vremena tretiranja, dok amplituda nije blizu statističke značajnosti. Kod analize varijance za pH uzorka LUWI (prilog 7), vrijeme tretiranja i kvadratna interakcija vremena tretiranja posjeduju p-vrijednosti manje od 0,05 i smatraju se statistički značajnim parametrima.

Grafički prikaz odzivne površine uzorka LUWI (prilog 11) ukazuje na neujednačen utjecaj amplitude i vremena tretiranja na pH tijekom provedbe tretmana. pH vrijednosti na kraju tretmana, manje su od početnih. Polinom optimizacije za pH uzorka LUWI (prilog 13) opisuje ponašanje polinoma, ovisno o ulaznim vrijednostima (amplituda i vrijeme tretiranja).

Optimizacijom parametara (prilog 16), dobivene su vrijednosti ulaznih parametara amplitude (100 %) i vremena tretiranja (3 min) poželjne za maksimizaciju pH vrijednosti uzorka nakon provedene UAE. Optimalna pH vrijednost uzorka LUWI iznosi 7,22739.

#### *4.4.3.4. Statistička analiza eksperimenta – električna vodljivost*

Kod Pareto dijagrama električne vodljivosti uzorka LUWI (prilog 3), uočena je velika statistička značajnost ulaznih vrijednosti amplitude i vremena tretiranja, kao i kod ukupnih proteina i fenola istog uzorka. Podaci dani u prilogu 7 pokazuju iznimno niske p-vrijednosti ulaznih parametara amplitude i vremena tretiranja, što povećava značajnost njihova utjecaja na izlazne vrijednosti električne vodljivosti uzorka LUWI.



Dijagram odzivne površine za električnu vodljivost uzorka LUWI potvrđuje MANOVA analizu. Više vrijednosti električne vodljivosti postižu se povećanjem ulaznih parametara. Jednadžba regresije za električnu vodljivost uzorka LUWI (prilog 13) opisuje kako se ponaša polinom, zavisno o vrijednostima amplitude i vremena tretiranja.

Za postizanje maksimalne izlazne vrijednosti električne vodljivosti, optimalna amplituda je 100 %, a optimalno vrijeme tretiranja 9 minuta (prilog 16). Optimalna vrijednost električne vodljivosti uzorka LUWI iznosi  $0,973778 \text{ mS cm}^{-1}$ .

#### *4.4.3.5. Statistička analiza eksperimenta – ukupna promjena energije*

U slučaju ukupne promjene energije uzorka LUWI, statističku značajnost prema Pareto dijagramu iz priloga 3, pokazuje isključivo amplituda. MANOVA izrađena za ukupnu promjenu energije uzorka LUWI (prilog 7) pokazuje da jedino amplituda ima značajan utjecaj, s obzirom na p-vrijednost manju od 0,05 na razini pouzdanosti od 95,0 %. Ostali parametri nemaju statistički značajan utjecaj ( $p > 0,05$ ).

Dijagram odzivne površine uzorka LUWI (prilog 11) ukazuje na veliki porast ukupne promjene energije s obzirom na povećanje amplitude. Vidljiv je i porast energije tijekom trajanja UAE, ali je slabije izražen. Jednadžba regresije za ukupnu promjenu energije uzorka LUWI nalazi se u prilogu 13 i opisuje promjenu izlazne vrijednosti, zavisno o vrijednostima amplitude i vremena tretiranja.

Za maksimalnu izlaznu vrijednost ukupne promjene energije uzorka LUWI (prilog 16), potrebna je amplituda od 100 % i vrijeme trajanja ekstrakcije od 9 min. Optimalna vrijednost ukupne promjene energije iznosi 151,532 W.

#### *4.4.4. Rezultati statističke obrade i optimiranja parametara za uzorak LUWW*

##### *4.4.4.1. Statistička analiza eksperimenta – ukupni proteini*

Iz Pareto dijagrama u prilogu 4, vidljivo je da na ukupne proteine uzorka LUWW statistički značajan utjecaj imaju ulazni parametri – amplituda i vrijeme tretiranja, dok ostali parametri nisu blizu statističke značajnosti. MANOVA ukupnih proteina uzorka LUWW (prilog 8) pokazuje da amplituda i vrijeme tretiranja imaju p-vrijednosti manje od 0,05 i time posjeduju statistički

značajan utjecaj na izlaznu vrijednost ukupnih proteina. Pri tome, amplituda ima veći značaj u odnosu na vrijeme tretiranja.

Na dijagramu odzivne površine uzorka LUWW (prilog 12), vidljiv je veliki utjecaj rasta amplitude na povećanje udjela ukupnih proteina, posebno kod duljeg vremena trajanja tretmana UAE. Jednadžba regresije za ukupne proteine uzorka LUWW (prilog 13) opisuje kako se ponaša polinom dobiven iz obrađenih rezultata, zavisno o ulaznim vrijednostima UAE.

U skladu s dijagramom odzivne površine, optimalne vrijednosti ulaznih parametara su očekivano najviša vrijednost amplitude (100 %) i najdulje vrijeme trajanja UAE (9 min) (prilog 17). Optimalna vrijednost ukupnih proteina za uzorak LUWW iznosi 157,46 mg (g<sub>s.tv.</sub>)<sup>-1</sup>.

#### *4.4.4.2. Statistička analiza eksperimenta – ukupni fenolni spojevi*

U prilogu 4, vidljivo je da na izlazne vrijednosti ukupnih fenola uzorka LUWW statistički značajan utjecaj ima samo amplituda, iako je i parametar vremena tretiranja jako blizu statističke značajnosti. Prema podacima u tablici iz priloga 8, koja sadrži rezultate analize varijance za ukupne fenole uzorka LUWW, može se vidjeti da je p-vrijednost amplitude jako udaljena od 0,05 (p<0,05). Također, može se primijetiti da je p-vrijednost vremena tretiranja jako blizu 0,05; no ipak ne prelazi granicu statističke značajnosti.

Dijagram odzivne površine (prilog 12) pokazuje porast ukupnih fenola uzorka LUWW s povećanjem ulaznih vrijednosti amplitude i vremena tretiranja, uz amplitudu kao statistički značajan parametar. Jednadžba regresije za ukupne fenole uzorka LUWW nalazi se u prilogu 13.

U skladu s rezultatima prikazanim na dijagramu odzivne površine, optimizacija ulaznih parametara za maksimalne izlazne vrijednosti ukupnih fenola uzorka LUWW daje optimalnu vrijednost amplitude od 100 % i vrijeme trajanja ekstrakcije od 9 minuta. Optimalna izlazna vrijednost ukupnih fenola uzorka LUWW iznosi 16,847 mg (g<sub>s.tv.</sub>)<sup>-1</sup> (prilog 17).

#### *4.4.4.3. Statistička analiza eksperimenta – pH vrijednost*

Statistička analiza značajnosti utjecaja ulaznih parametara i njihovih interakcija, prikazana pomoću Pareto dijagrama, pokazuje da niti jedan parametar nema statistički značajan utjecaj na pH uzorka LUWW (prilog 4). Isti rezultat vidljiv je iz tablice u prilogu 8, gdje niti jedan ulazni

parametar, kao ni njihove interakcije, nemaju statistički značajan utjecaj na izlazne pH vrijednosti uzorka LUWI, sa p-vrijednostima većim od 0,05.

Dijagram sa slike iz priloga 12 pokazuje zanimljiv odnos promjene pH vrijednosti uzorka LUWW, obzirom na porast amplitude i vremena tretiranja. Povećanjem amplitude, pH uglavnom opada. Dulje vrijeme trajanja ekstrakcije uzorkuje promjene pH vrijednosti, ali se iz grafičkog prikaza ne može lako zaključiti direktna korelacija tih dvaju parametara. Jednadžba regresije za pH uzorka LUWW (prilog 13) opisuje kako se ponaša polinom dobiven iz obrađenih rezultata, zavisno o vrijednostima amplitude i vremena tretiranja.

Optimizacijom (prilog 17) dobivene su vrijednosti amplitude od 71,7633 % i vremena trajanja UAE od 3 minute. Optimalna pH vrijednost uzorka LUWW, dobivena statističkom analizom, iznosi 7,29037.

#### *4.4.4.4. Statistička analiza eksperimenta – električna vodljivost*

Prilikom analize utjecaja ulaznih parametara i njihovih interakcija na električnu vodljivost uzorka LUWW, dobiveno je da statističku značajnost imaju samo ulazni parametri amplitude i vremena tretiranja, kao što je vidljivo na grafičkom prikazu (prilog 4). MANOVA za električnu vodljivost uzorka LUWW (prilog 8) daje informacije o p-vrijednostima ispitivanih parametara, od kojih amplituda i vrijeme tretiranja pokazuju statistički bitan utjecaj na izlazne vrijednosti, uz  $p < 0,05$ .

Dijagram odzivne površine (prilog 12) daje jasniji uvid na promjenu električne vodljivosti s porastom amplitude i vremena tretiranja. U slučaju uzorka LUWW, radi se o većoj provodljivosti s obzirom na porast ulaznih parametara UAE. Jednadžba regresije za električnu vodljivost uzorka LUWW nalazi se u prilogu 13.

Optimalne vrijednosti amplitude i vremena tretiranja za postizanje maksimalnih izlaznih vrijednosti su ujedno i maksimalne vrijednosti provedbe tretmana UAE – 100 % i 9 minuta. Optimalna vrijednost električne vodljivosti je  $1,05822 \text{ mS cm}^{-1}$  (prilog 17).

#### 4.4.4.5. Statistička analiza eksperimenta – ukupna promjena energije

Pareto dijagram za ukupnu promjenu energije uzorka LUWW (prilog 4) pokazuje statistički značajan utjecaj ulaznih parametara amplitude i vremena tretiranja na izlazne vrijednosti. Utjecaj amplitude je statistički značajniji od vremena tretiranja. U tablici iz priloga 8 nalaze se p-vrijednosti ulaznih parametara, od kojih su jedino vrijednosti amplitude i vremena tretiranja manje od 0,05 i imaju statistički značajan utjecaj na električnu vodljivost uzorka LUWW.

Dijagram odzivne površine (prilog 12) pokazuje porast ukupne promjene energije s obzirom na povećanje ulaznih parametara amplitude i vremena tretiranja, pri čemu obje varijable imaju statistički značajan utjecaj na izlazne vrijednosti energije. Polinom optimizacije za ukupnu promjenu energije uzorka LUWW (prilog 13) opisuje promjenu ukupne promjene energije, zavisno o vrijednostima amplitude i vremena tretiranja.

Optimalne vrijednosti amplitude i vremena tretiranja dobivene statističkom analizom (prilog 17) su ujedno i maksimalne primijenjene vrijednosti kod provedbe UAE, a iznose 100 % i 9 minuta. Optimalna vrijednost ukupne promjene energije za uzorka LUWW iznosi 125,83 W.

Iz rezultata statističke obrade podataka UAE uzoraka LUDI, LUDW, LUWI i LUWW, može se zaključiti da je kod izlaznih vrijednosti ukupnih proteina svih ekstrakata prisutan statistički značajan utjecaj primijenjene amplitude i vremena tretiranja. Optimizacijom ulaznih parametara za maksimalnu izlaznu vrijednost ukupnih proteina, optimalne vrijednosti amplitude su za uzorke LUDW, LUWI i LUWW iznosile 100%, a za uzorak LUDI 88,8589 %; dok su optimalne vrijednosti vremena tretiranja za uzorke LUDI, LUWI i LUWW iznosile 9 minuta, a za uzorak LUDW 8 minuta. Usporedbom uzoraka pripremljenih sa svježim listovima (LUWI i LUWW), javlja se povezanost s obzirom na statistički značajan utjecaj amplitude na izlazne parametre ukupnih fenola, električne vodljivosti i ukupne promjene energije; uz optimalne vrijednosti amplitude od 100 %. Usporedbom uzoraka pripremljenih sa sušenim listovima (LUWI i LUWW), vidljiva je povezanost s obzirom na statistički značajan utjecaj amplitude na pH, uz optimalne vrijednosti amplitude od 100 %. Kod uzoraka pripremljenih sa svježim listovima, amplituda nema statistički značajan utjecaj na pH.

## 4.5. REZULTATI STATISTIČKE OBRADJE PODATAKA TOPLINSKE EKSTRAKCIJE

### 4.5.1. Rezultati analize varijance (ANOVA) za uzorak LDO

**Tablica 16.** Analiza varijance za ukupne proteine uzorka LDO

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*	f (kritično)
Između skupina**	6372,697	1	6372,69692	383,4598328	0,000040105	7,708647422
Unutar skupina**	66,47577	4	16,6189425	/	/	/
Ukupno	6439,173	5	/	/	/	/

\*utjecaj parametra je statistički značajan ako je  $p < 0,05$ ; statistički značajna vrijednost označena je crveno

\*\*skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); vrijednosti ukupnih proteina [ $\text{mg (g}_{s.\text{iv.}}^{-1}$ )] (tablica 13)

ANOVA za ukupne proteine uzorka LDO, tretiranog u kupelji, pokazuje statističku značajnost vremena tretiranja na izlazne vrijednosti udjela proteina u ekstraktu na razini pouzdanosti od 95,0 % ( $p < 0,05$ ).

**Tablica 17.** Analiza varijance za ukupne fenole uzorka LDO

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*	f (kritično)
Između skupina**	79,50691	1	79,50691	15,06134	0,017828	7,708647
Unutar skupina**	21,1155	4	5,278874	/	/	/
Ukupno	100,6224	5	/	/	/	/

\*utjecaj parametra je statistički značajan ako je  $p < 0,05$ ; statistički značajna vrijednost označena je crveno

\*\*skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); vrijednosti ukupnih fenola [ $\text{mg (g}_{s.\text{iv.}}^{-1}$ )] (tablica 13)

Kod provedene ANOVA analize za ukupne fenole uzorka LDO, također je vidljiva statistička značajnost vremena tretiranja na izlazne vrijednosti udjela fenolnih spojeva u ekstraktu ( $p < 0,05$ ). Usporedbom p-vrijednosti (tablice 16 i 17) uočava se da vrijeme tretiranja ima značajniji utjecaj na ukupne proteine, u odnosu na fenole.

**Tablica 18.** Analiza varijance za pH vrijednosti uzorka LDO

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*	f (kritično)
Između skupina**	1,168651	1	1,168651	0,259694	0,637159	7,708647
Unutar skupina**	18,0004	4	4,500101	/	/	/
Ukupno	19,16905	5	/	/	/	/

\*utjecaj parametra je statistički značajan ako je  $p < 0,05$

\*\*skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); pH vrijednosti (tablica 13)

Analiza varijance za pH vrijednost, javlja p-vrijednost između skupina koja je veća od 0,05 i prema tome vrijeme tretiranja nema statistički značajan utjecaj na pH vrijednosti ekstrakta LDO izmjerene nakon tretmana u kupelji.

**Tablica 19.** Analiza varijance za električnu vodljivost uzorka LDO

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*	f (kritično)
Između skupina**	2,294017	1	2,294017	0,491938	0,521724	7,708647
Unutar skupina**	18,65288	4	4,66322	/	/	/
Ukupno	20,9469	5	/	/	/	/

\*utjecaj parametra je statistički značajan ako je  $p < 0,05$

\*\*skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); vrijednosti električne vodljivosti [ $\text{mS cm}^{-1}$ ] (tablica 13)

ANOVA za električnu vodljivost pokazuje isti ishod kao i podaci iz tablice 18, pri čemu vrijeme tretiranja nema statistički značajan utjecaj na vrijednosti električne vodljivosti uzorka LDO (tablica 19), s p-vrijednosti većom od 0,05.

#### 4.5.2. Rezultati analize varijance (ANOVA) za uzorak LWO

**Tablica 20.** Analiza varijance za ukupne proteine uzorka LWO

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*	f (kritično)
Između skupina**	7120,214	1	7120,214	991,518	0,000006062	7,708647
Unutar skupina**	28,7245	4	7,181124	/	/	/
Ukupno	7148,938	5	/	/	/	/

\*utjecaj parametra je statistički značajan ako je  $p < 0,05$ ; statistički značajna vrijednost označena je crveno

\*\*skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); vrijednosti ukupnih proteina [ $\text{mg (g}_{\text{s.tv.}})^{-1}$ ] (tablica 14)

Rezultati analize varijance ukupnih proteina uzorka LWO (tablica 20) pokazuju  $p < 0,05$  između skupina, što znači da vrijeme tretiranja kao i kod prethodnog uzorka, tretiranog u kupelji, ima statistički značajan utjecaj na izlazne vrijednosti proteina.

**Tablica 21.** Analiza varijance za ukupne fenole uzorka LWO

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*	f (kritično)
Između skupina**	4,559711	1	4,559711	0,87841	0,4017	7,708647
Unutar skupina**	20,76348	4	5,19087	/	/	/
Ukupno	25,32319	5	/	/	/	/

\*utjecaj parametra je statistički značajan ako je  $p < 0,05$

\*\*skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); vrijednosti ukupnih fenola [ $\text{mg (g}_{\text{s.tv.}})^{-1}$ ] (tablica 14)

U odnosu na uzorak LDO, vrijeme tretiranja ne pokazuje statistički značajan utjecaj na izlazne vrijednosti ukupnih fenola kod uzorka LWO ( $p > 0,05$ ) (tablica 21).

**Tablica 22.** Analiza varijance za pH vrijednosti uzorka LWO

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*	f (kritično)
Između skupina**	2,26935	1	2,26935	0,504296	0,516827	7,708647
Unutar skupina**	18,00013	4	4,500034	/	/	/
Ukupno	20,26948	5	/	/	/	/

\*utjecaj parametra je statistički značajan ako je  $p < 0,05$

\*\*skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); pH vrijednosti (tablica 14)

ANOVA za pH vrijednosti uzorka LWO (tablica 22), javlja nepostojeću statističku značajnost između skupina uz p-vrijednost veću od 0,05.

**Tablica 23.** Analiza varijance za električnu vodljivost uzorka LWO

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*	f (kritično)
Između skupina**	35,65331	1	35,65331	7,922861	0,048084	7,708647
Unutar skupina**	18,00022	4	4,500055	/	/	/
Ukupno	53,65353	5	/	/	/	/

\*utjecaj parametra je statistički značajan ako je  $p < 0,05$ ; statistički značajna vrijednost označena je crveno

\*\*skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); vrijednosti električne vodljivosti [ $\text{mS cm}^{-1}$ ] (tablica 14)

Za razliku od uzorka LDO, tablica 23 prikazuje statističku značajnost vremena tretiranja na izlazne vrijednosti električne vodljivosti uzorka LWO, obzirom da je p-vrijednost između skupina manja od 0,05.

Iz rezultata statističke obrade podataka toplinske ekstrakcije uzorka LDO i LWO, zaključuje se da vrijeme tretiranja ima statistički značajan utjecaj na izlazne vrijednosti ukupnih proteina kod obje vrste uzoraka. Usporedbom rezultata statističke obrade podataka obiju ekstrakcija, slijedi zaključak da vrijeme tretiranja ima statistički značajan utjecaj na udio ukupnih proteina kod uzoraka tretiranih UAE, kao i kod uzoraka tretiranih u kupelji.



## 5. ZAKLJUČCI

1. UAE i toplinska ekstrakcija ukupnih proteina i fenola, iz osušenih i svježih uzoraka lista šećerne repe, uspješno su provedene. UAE daje veći prinos proteina i fenola, u odnosu na toplinsku ekstrakciju. Najveći udio ukupnih proteina iznosi  $147,9095 \pm 4,58 \text{ mg (g}_{s.tv.})^{-1}$ , a ukupnih fenola  $17,8924 \pm 0,38 \text{ mg (g}_{s.tv.})^{-1}$  (uz amplitudu 100 % i vrijeme tretiranja 9 min).
2. Uzorci tretirani UAE imaju veći udio ukupnih proteina od uzoraka tretiranih toplinom. Uzorci sa svježim listovima imaju veći udio ukupnih proteina u odnosu na one sa sušenim listovima. Nema direktne korelacije između temperature ekstrakcijskog otapala i ukupnih proteina.
3. Udio vlage u listovima (sušeni/svježi) pokazuje veći utjecaj na konačan prinos ukupnih fenola nego temperatura korištenog ekstrakcijskog otapala i primijenjena metoda ekstrakcije.
4. pH vrijednost viša je kod uzoraka sa svježim listovima i kojima je dodano hladno ekstrakcijsko otapalo. pH vrijednosti drugačije su prije i nakon provedenih ekstrakcija.
5. Električna vodljivost veća je kod uzoraka sa sušenim listovima. Uzorci podvrgnuti toplinskoj ekstrakciji imaju veću električnu vodljivost od uzoraka tretiranih UAE. Vrijednosti električne vodljivosti drugačije su prije i nakon provedenih ekstrakcija.
6. Uzorci sa sušenim listovima imaju više srednje vrijednosti temperature, snage, energije, ukupne promjene energije i gustoće snage. Temperatura ekstrakcijskog otapala utječe na ukupnu temperaturu sustava tijekom UAE, ali nema utjecaj na promjenu ostalih vrijednosti.
7. Statističkom analizom rezultata UAE utvrđen je statistički značajan utjecaj amplitude i vremena tretiranja ( $p < 0,05$ ) na izlazne vrijednosti ukupnih proteina svih ekstrakata.
8. Kod uzoraka sa svježim listovima, amplituda pokazuje statistički značajan utjecaj na izlazne parametre ukupnih fenola, električne vodljivosti i ukupne promjene energije, uz optimalnu vrijednost amplitude 100 %. Kod uzoraka sa sušenim listovima, amplituda ima statistički značajan utjecaj na pH, uz optimalnu vrijednost amplitude 100 %.
9. Statističkom analizom rezultata toplinske ekstrakcije utvrđen je statistički značajan utjecaj vremena tretiranja ( $p < 0,05$ ) na vrijednosti ukupnih proteina i fenola uzoraka sa sušenim listovima; te na ukupne proteine i električnu vodljivost uzoraka sa svježim listovima.
10. UAE uz vodu kao zeleno otapalo predstavlja učinkovitu strategiju za smanjenje gubitaka i povećanje iskorištenja nusproizvoda, ekstrakcijom bioaktivnih spojeva iz lista šećerne repe, istovremeno promičući održivost u poljoprivredno-prehrambenom lancu.

## 6. LITERATURA

Akyüz A, Ersus S (2021) Optimization of enzyme assisted extraction of protein from the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves for alternative plant protein concentrate production. *Food Chem* **335**, 127673. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127673>

Alam M (2019) Anti-hypertensive effect of cereal antioxidant ferulic acid and its mechanism of action. *Front Nutr* **6**, 121. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00121>

Alexandre EM, Moreira SA, Castro LM, Pintado M, Saraiva JA (2017) Emerging technologies to extract high added value compounds from fruit residues: sub/supercritical, ultrasound-, and enzyme-assisted extractions. *Food Rev Int* **28**, 1-32. <https://doi.org/10.1080/87559129.2017.1359842>

Azmir J, Zaidul I, Rahman M, Sharif K, Mohamed A, Sahena F, i sur. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* **117**, 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>

Berlowska J, Binczarski M, Dziugan P, Wilkowska A, Kregiel D, Witonska I (2018) Sugar beet pulp as a source of valuable biotechnological products. U: Grumezescu AM, Holban AM (ured.) Handbook of Food Bioengineering: Advances in Biotechnology for food industry, 14. izd., Academic Press, Cambridge, str. 359-392.

Boland MJ, Rae AN, Vereijken JM, Meuwissen MP, Fischer AR, van Boekel MA, i sur. (2013) The future supply of animal-derived protein for human consumption. *Trends Food Sci Tech* **29**, 62-73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.07.002>

Chang SKC, Zhang Y (2017) Protein Analysis. U: Nielsen SS (ured.) Food Analysis. Food Science Text Series, Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_18)

Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, AbertVian M (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A Review. *Ultrason Sonochem* **34**, 540-560. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>

Chemat F, Vian MA, Cravotto G (2012) Green extraction of natural products: Concept and principles. *Int J Mol Sc.* **13**, 8615-8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>

Chemat F, Vian MA, Fabiano-Tixier AS, Nutrizio M, Režek Jambrak A, Munekata PE, i sur. (2020) A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. *Green Chem* **22**, 2325-2353. <https://doi.org/10.1039/C9GC03878G>

Cravotto G, Binello A (2016) Low-frequency, high-power ultrasound-assisted food component extraction. U: Knoerzer K, Juliano P, Smithers G (ured.) Innovative food processing technologies: Extraction, Separation, Component Modification and Process Intensification, Woodhead Publishing, Sawston, str. 3-29.

Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A (2013) Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxid Redox Sign* **18**, 1818-1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>

EC (2019) Europski zeleni plan: komunikacija komisije europskom parlamentu, europskom vijeću, vijeću, europskom gospodarskom i socijalnom odboru i odboru regija. EC-Europska komisija, [https://mingor.gov.hr/UserDocsImages/Istaknute%20teme/Zeleni%20plan/Europski%20zeleni%20plan%20HR%20\(pdf\).pdf](https://mingor.gov.hr/UserDocsImages/Istaknute%20teme/Zeleni%20plan/Europski%20zeleni%20plan%20HR%20(pdf).pdf). Pristupljeno 8. prosinca 2021.

Edelman M, Colt M (2016) Nutrient value of leaf vs. seed. *Front Chem* **4**, 32. <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00032>

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.

Falcone PM, Imbert E (2017) Bringing a sharing economy approach into the food sector: The potential of food sharing for reducing food waste. U: Morone P, Papendiek F, Tartiu VE (ured.) Food waste reduction and valorisation, Springer, Berlin, str. 197-214.

FAO (2011) Global food losses and food wastes: extent, cause and prevention. FAO-Organizacija za hranu i poljoprivredu, <https://www.fao.org/3/i2697e/i2697e.pdf>. Pristupljeno 12. prosinca 2021.

Garrido T, Uranga J, Guerrero P, de la Caba K (2018) The Potential of Vegetal and Animal Proteins to Develop More Sustainable Food Packaging. U: Gutiérrez T (ured.) *Polymers for Food Applications*, Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-94625-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-94625-2_3)

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

Gharib-Bibalan S (2018) High value-added products recovery from sugar processing by-products and residuals by green technologies: Opportunities, challenges, and prospects. *Food Eng Rev* **10**, 95-111. <https://doi.org/10.1007/s12393-018-9174-1>

Gómez-Guillén MC, Giménez B, López-Caballero MA, Montero MP (2011) Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloid* **25**, 1813-1827. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>

Hayati Zeidanloo M, Ahmadzadeh Ghavidel R, Ghiafeh Davoodi M, Arianfar A (2019) Functional properties of Grass pea protein concentrates prepared using various precipitation methods. *J Food Sci Tech* **56**, 4799-4808. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03930-3>

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

Henchion M, Hayes M, Mullen AM, Fenelon M, Tiwari B (2017) Future protein supply and demand: strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. *Foods* **6**, 53. <https://doi.org/10.3390/foods6070053>

Hussein RA, El-Anssary AA (2019) Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. U: Builders PF (ured.) *Herbal medicine*, IntechOpen, London, str. 11-28.

Karaca AC, Low NH, Nickerson MT (2015) Potential use of plant proteins in the microencapsulation of lipophilic materials in foods. *Trends Food Sci Tech* **42**, 5-12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.11.002>

Katiyar V, Ghosh T (2021) Nanotechnology in Edible Food Packaging: Food Preservation Practices for a Sustainable Future, Springer Nature, Singapore.

Kaur L, Lamsar H, López IF, Filippi M, Ong Shu Min D, Ah-Sing K, i sur. (2021) Physico-chemical characteristics and in vitro gastro-small intestinal digestion of New Zealand ryegrass proteins. *Foods* **10**, 331. <https://doi.org/10.3390/foods10020331>

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

Kulkarni VM, Rathod VK (2014) Mapping of an ultrasonic bath for ultrasound assisted extraction of mangiferin from *Mangifera indica* leaves. *Ultrason Sonochem* **21**, 606-611. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.08.021>

Kumar P, Chatli MK, Mehta N, Singh P, Malav OP, Verma AK (2017) Meat analogues: health promising sustainable meat substitutes. *Crit Rev Food Sci* **57**, 923-932. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.939739>

Lammens TM, Franssen MCR, Scott EL, Sanders JPM (2012) Availability of protein-derived amino acids as feedstock for the production of bio-based chemicals. *Biomass Bioenerg* **44**, 168-181. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.04.021>

Lamuela-Raventós RM (2017) Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. U: Apak R, Capanoglu E, Shahidi F (ured.) Measurement of antioxidant activity and capacity: Recent trends and applications, Wiley, str. 107-115. <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch6>

Li W, Ma H, He R, Ren X, Zhou C (2021) Prospects and application of ultrasound and magnetic fields in the fermentation of rare edible fungi. *Ultrason Sonochem* **76**, 105613. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105613>

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

- McClements DJ, Grossmann L (2021) The science of plant-based foods: Constructing next-generation meat, fish, milk, and egg analogs. *Compr Rev Food Sci F* **20**, 4049-4100. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12771>
- Merouani S, Hamdaoui O, Rezgui Y, Guemini M (2014) Theoretical estimation of the temperature and pressure within collapsing acoustical bubbles. *Ultrason Sonochem* **21**, 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.05.008>
- Nasrabadi MN, Doost AS, Mezzenga R (2021) Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products. *Food Hydrocolloid* **118**, 106789. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106789>
- Nieuwland M, Geerdink P, Engelen-Smit NP, van Der Meer IM, America AH, Mes JJ, i sur. (2021) Isolation and gelling properties of duckweed protein concentrate. *ACS Food Sci Technol*, **1**, 908-916. <https://doi.org/10.1021/acscfoodscitech.1c00009>
- Nutter J, Fernandez MV, Jagus RJ, Agüero MV (2021) Development of an aqueous ultrasound-assisted extraction process of bioactive compounds from beet leaves: a proposal for reducing losses and increasing biomass utilization. *J Sci Food Agr* **101**, 1989-1997. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10815>
- Nzekoue FK, Angeloni S, Navarini L, Angeloni C, Freschi M, Hrelia S, i sur. (2020) Coffee silverskin extracts: Quantification of 30 bioactive compounds by a new HPLC-MS/MS method and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Food Res Int* **133**, 109128. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109128>
- Peng LX, Zou L, Zhao JL, Xiang DB, Zhu P, Zhao G (2013) Response surface modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of three flavonoids from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Pharmacogn Mag* **9**, 210. <https://dx.doi.org/10.4103%2F0973-1296.113266>
- Phan MAT, Paterson J, Bucknall M, Arcot J (2018) Interactions between phytochemicals from fruits and vegetables: Effects on bioactivities and bioavailability. *Crit Rev Food Sci* **58**, 1310-1329. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1254595>

Pojić M, Mišan A, Tiwari B (2018) Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends Food Sci Technol* **75**, 93-104. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.010>

Pradal D, Vauchel P, Decossin S, Dhulster P, Dimitrov K (2016) Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization. *Ultrason Sonochem* **32**, 137-146. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.03.001>

Pradal D, Vauchel P, Decossin S, Dhulster P, Dimitrov K (2018) Integrated extraction-adsorption process for selective recovery of antioxidant phenolics from food industry by-product. *Chem Eng Process* **127**, 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2018.03.016>

Purvis B, Mao Y, Robinson D (2019) Three pillars of sustainability: in search of conceptual origins. *Sustain Sci* **14**, 681-695. <https://doi.org/10.1007/s11625-018-0627-5>

Rahman MM, Lamsal BP (2021) Ultrasound-assisted extraction and modification of plant-based proteins: Impact on physicochemical, functional, and nutritional properties. *Compr Rev Food Sci F* **20**, 1457-1480. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12709>

Rayner M, Ljusberg H, Emek SC, Sellman E, Erlanson-Albertsson C, Albertsson PÅ (2011) Chloroplast thylakoid membrane-stabilised emulsions. *J Sci Food Agr* **91**, 315-321. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4187>

Richards C, O'Connor N, Jose D, Barrett A, Regan F (2020) Selection and optimization of protein and carbohydrate assays for the characterization of marine biofouling. *Anal Methods-Uk* **12**, 2228-2236. <https://doi.org/10.1039/D0AY00272K>

Rosenfeld DL, Burrow AL (2017) Vegetarian on purpose: understanding the motivations of plant-based dieters. *Appetite* **116**, 456-463. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.05.039>

Rudra SG, Nishad J, Jakhar N, Kaur C (2015) Food industry waste: mine of nutraceuticals. *Int J Environ Sci Te* **4**, 205-229.

Sánchez-Rangel JC, Benavides J, Heredia JB, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA (2013) The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal Methods-Uk* **5**, 5990-5999. <https://doi.org/10.1039/C3AY41125G>

- Sarkar D, Shetty K (2014) Metabolic stimulation of plant phenolics for food preservation and health. *Annu Rev Food Sci T* **5**, 395-413. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092418>
- Schosler H, De Boer J, Boersema JJ (2012) Can we cut out the meat of the dish? Constructing consumer-oriented pathways towards meat substitution. *Appetite* **58**, 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2011.09.009>
- Shahidi F, Ambigaipalan P (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *J Funct Foods* **18**, 820-897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Stevanato P, Chiodi C, Broccanello C, Concheri G, Biancardi E, Pavli O, i sur. (2019) Sustainability of the sugar beet crop. *Sugar Tech* **21**, 703-716. <https://doi.org/10.1007/s12355-019-00734-9>
- Tamayo Tenorio A, Gieteling J, de Jong GA, Boom RM, van der Goot AJ (2016) Recovery of protein from green leaves: Overview of crucial steps for utilisation. *Food Chem* **203**, 402-408. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.092>
- Tamayo Tenorio A, Schreuders FKG, Zisopoulos FK, Boom RM, van der Goot AJ (2017) Processing concepts for the use of green leaves as raw materials for the food industry. *J Clean Prod* **164**, 736-748. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.06.248>
- Tanambell H, Møller AH, Corredig M, Dalsgaard TK (2022) RuBisCO from alfalfa—native subunits preservation through sodium sulfite addition and reduced solubility after acid precipitation followed by freeze-drying. *Lebensm Wiss Technol* **154**, 112682. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112682>
- Tiwari BK (2015) Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trac-Trend Anal Chem* **71**, 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>
- Tonini D, Albizzati PF, Astrup TF (2018) Environmental impacts of food waste: Learnings and challenges from a case study on UK. *Waste Manage* **76**, 744-766. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.03.032>



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

UN (2019) World Population Prospects 2019: Highlights, UN-Ujedinjeni Narodi, <https://www.un.org/development/desa/publications/world-population-prospects-2019-highlights.html>. Pristupljeno 12. prosinca 2021.

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

Vikulin P, Vikulina V (2020) Influence of ultrasound on the concentration of hydrogen ions in water. *Iop Conf Ser-Mat Sci* **869**: 042007. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/869/4/042007>

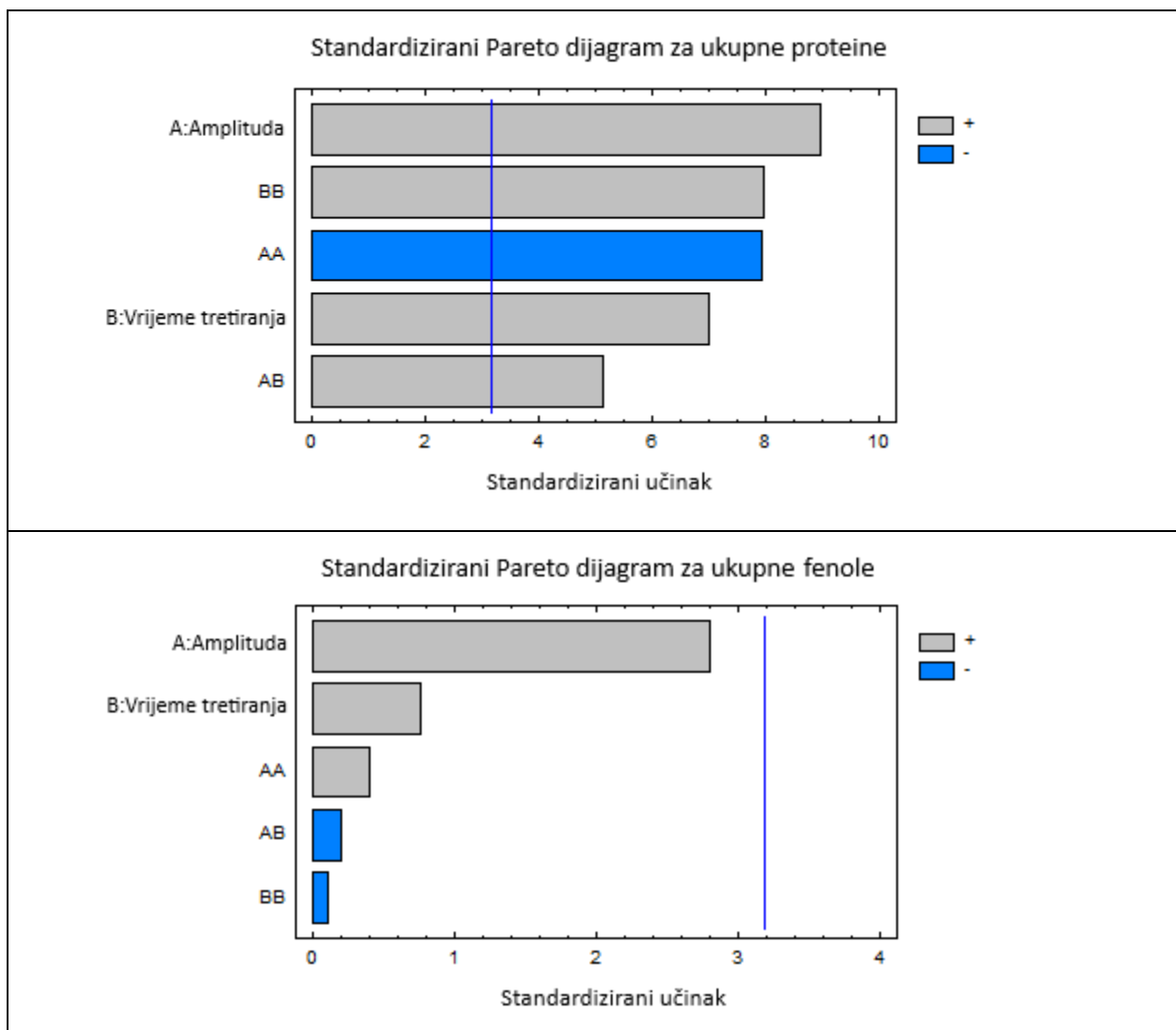
Vissers A, Kiskini A, Hilgers R, Marinea M, Wierenga PA, Gruppen H, Vincken JP (2017) Enzymatic browning in sugar beet leaves (*Beta vulgaris* L.): influence of caffeic acid derivatives, oxidative coupling, and coupled oxidation. *J Agr Food Chem* **65**, 4911-4920. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01897>

Wen C, Zhang J, Yao H, Zhou J, Duan Y, Zhang H i sur. (2019) Advances in renewable plant-derived protein source: The structure, physicochemical properties affected by ultrasonication. *Ultrason Sonochem* **53**, 83-98. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.12.036>

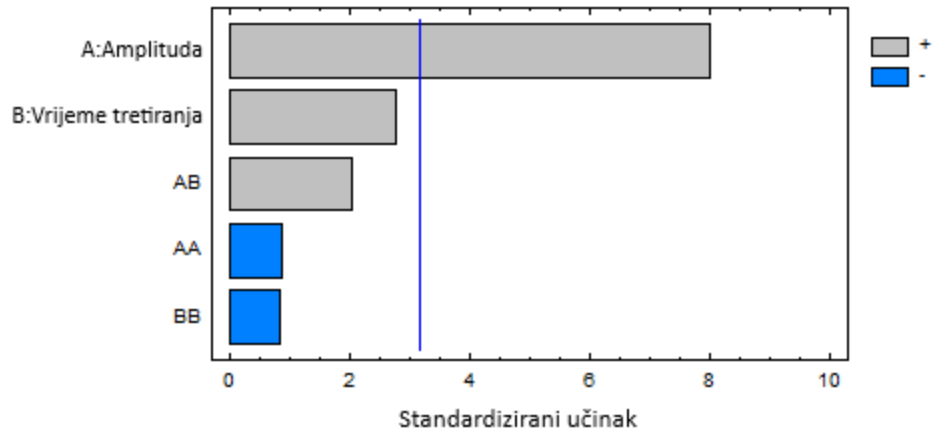
Zhang Y, Liu Q, Rempel C (2018) Processing and characteristics of canola protein-based biodegradable packaging: A review. *Crit Rev Food Sci* **58**, 475-485. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1193463>

## 7. PRILOZI

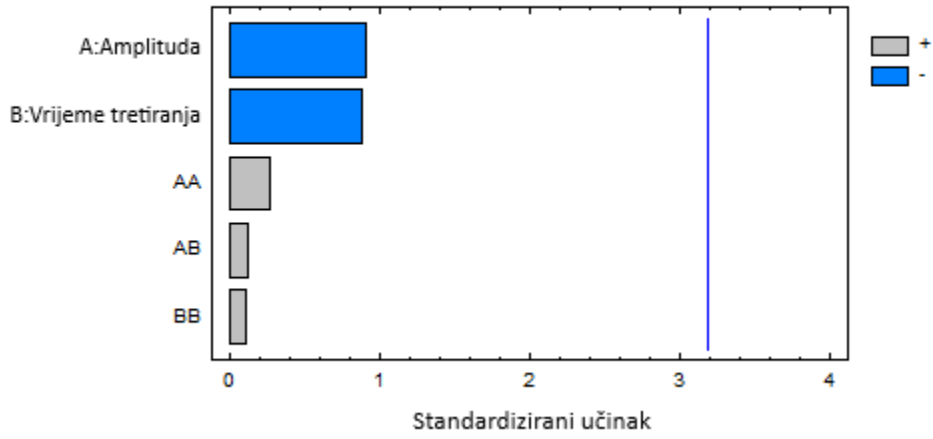
Prilog 1. Grafički prikazi statističke značajnosti utjecaja ulaznih parametara (amplituda, vrijeme tretiranja) i njihovih interakcija na ukupne proteine, ukupne fenole, pH, električnu vodljivost i ukupnu promjenu energije uzorka **LUDI**. AA-kvadratna interakcija amplitude; AB-interakcija amplitude i vremena tretiranja; BB-kvadratna interakcija vremena tretiranja; plava linija-krajnja vrijednost statističke značajnosti utjecaja.



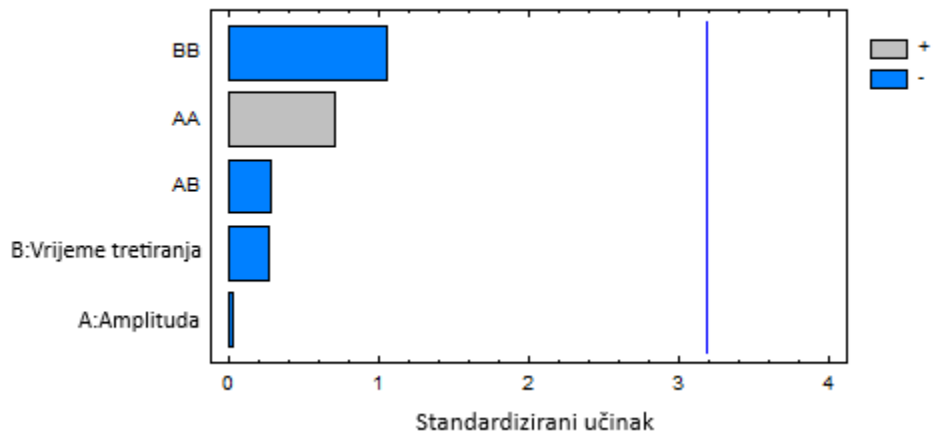
Standardizirani Pareto dijagram za pH



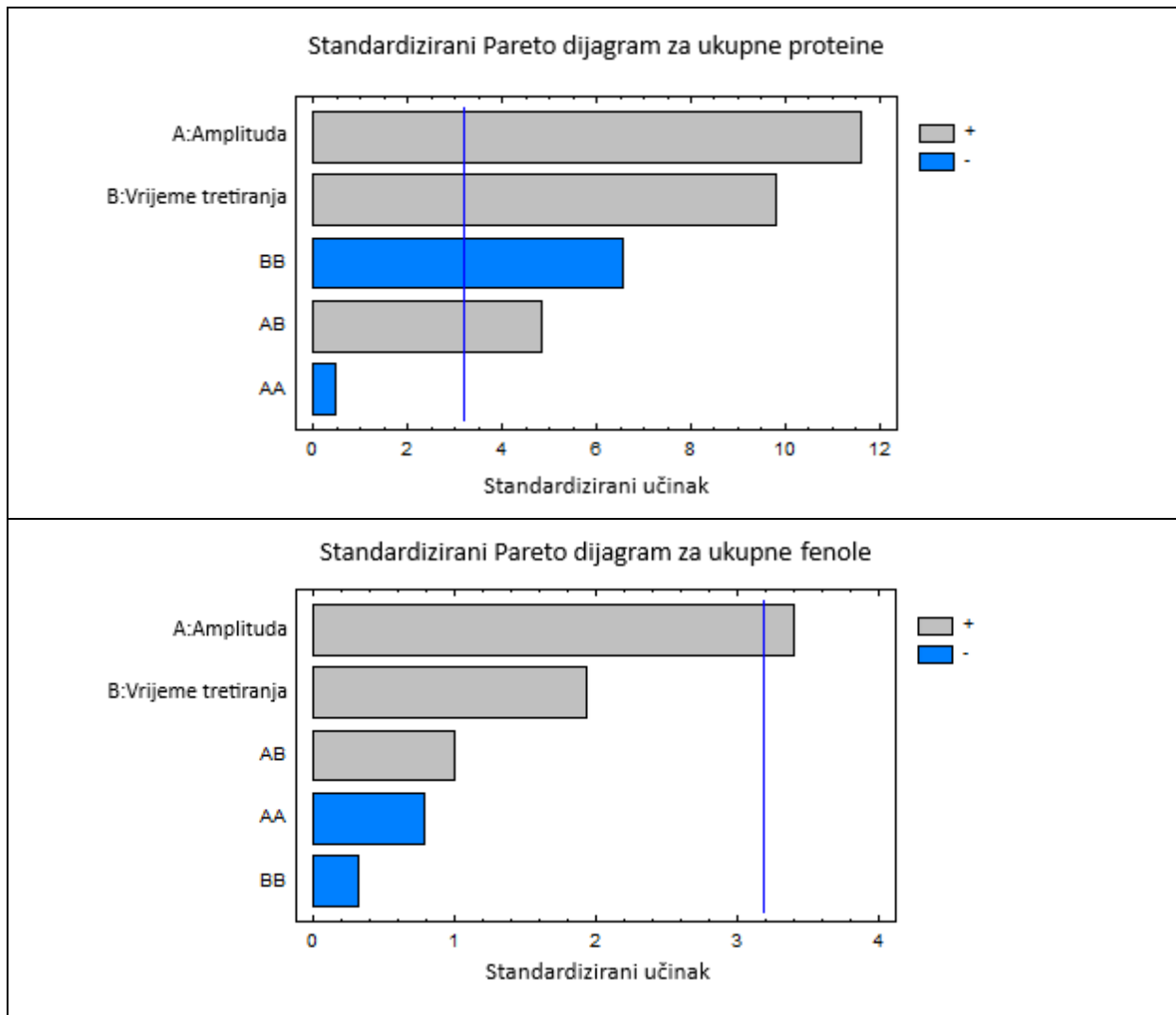
Standardizirani Pareto dijagram za električnu vodljivost



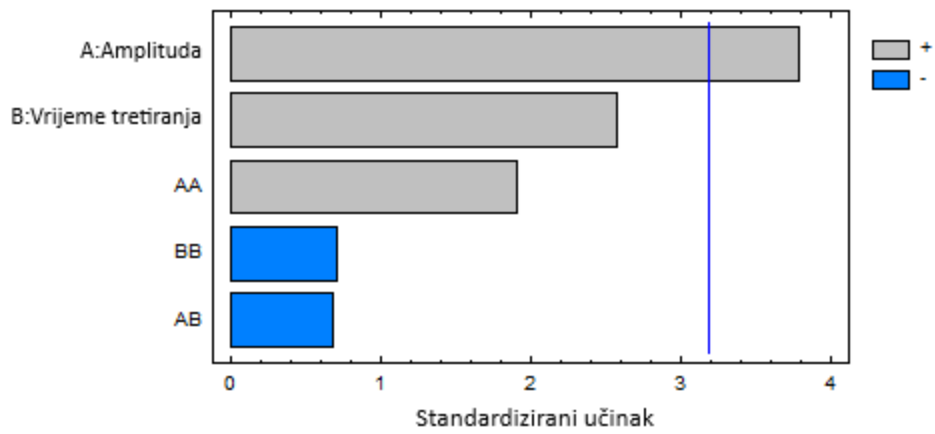
Standardizirani Pareto dijagram za ukupnu promjenu energije



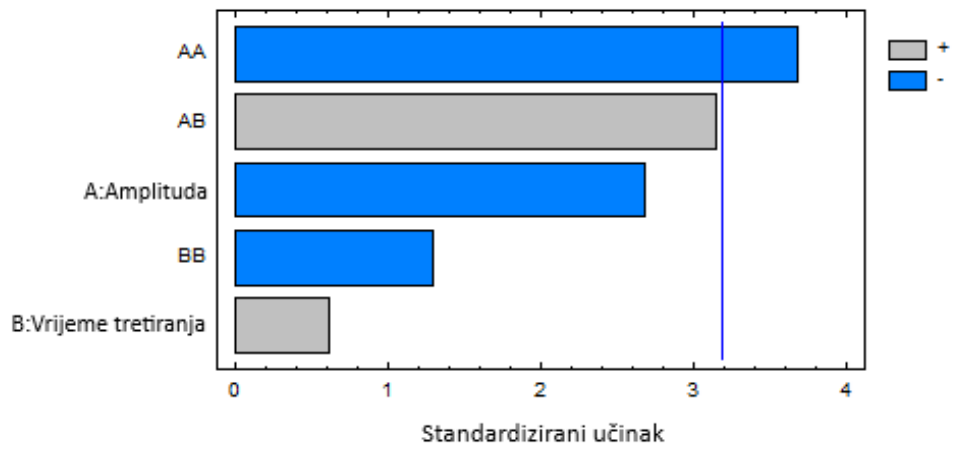
Prilog 2. Grafički prikazi statističke značajnosti utjecaja ulaznih parametara (amplituda, vrijeme tretiranja) i njihovih interakcija na ukupne proteine, ukupne fenole, pH, električnu vodljivost i ukupnu promjenu energije uzorka **LUDW**. AA-kvadratna interakcija amplitude; AB-interakcija amplitude i vremena tretiranja; BB-kvadratna interakcija vremena tretiranja; plava linija-krajnja vrijednost statističke značajnosti utjecaja.



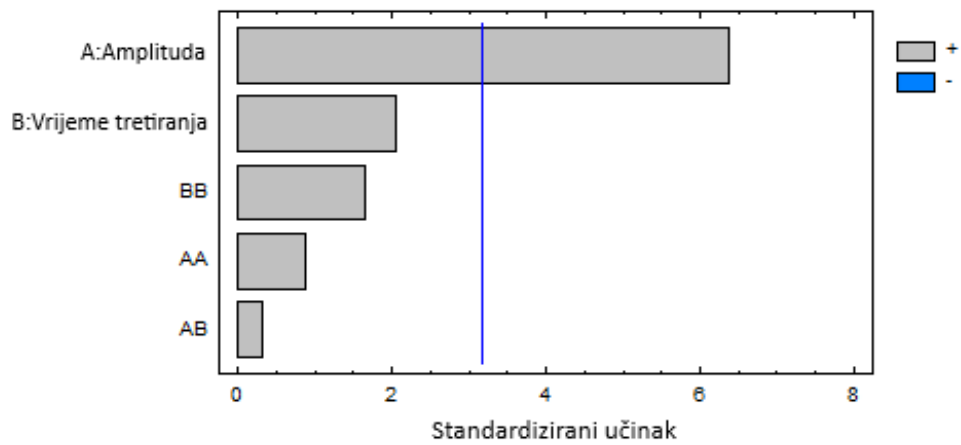
Standardizirani Pareto dijagram za pH



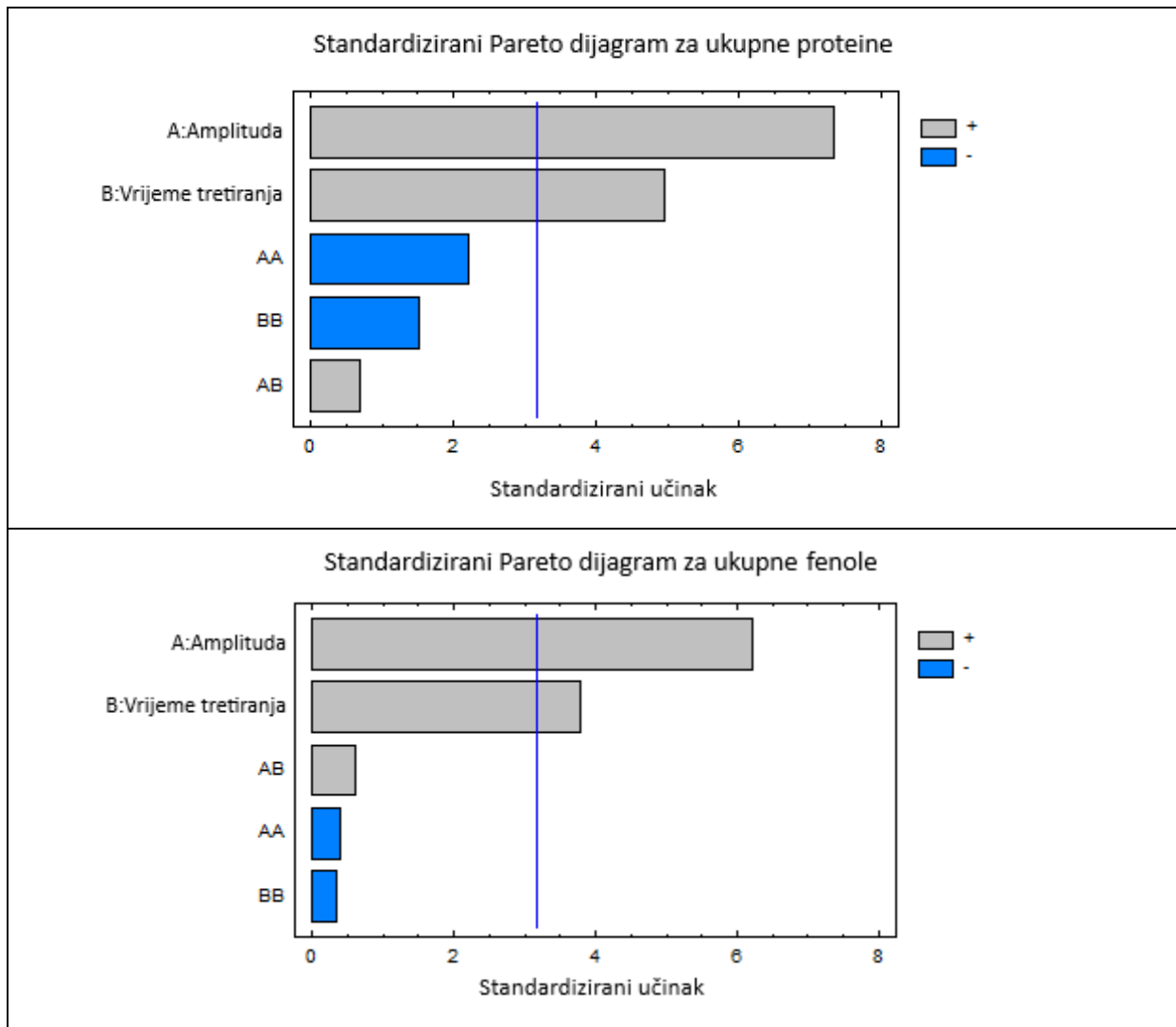
Standardizirani Pareto dijagram za električnu vodljivost



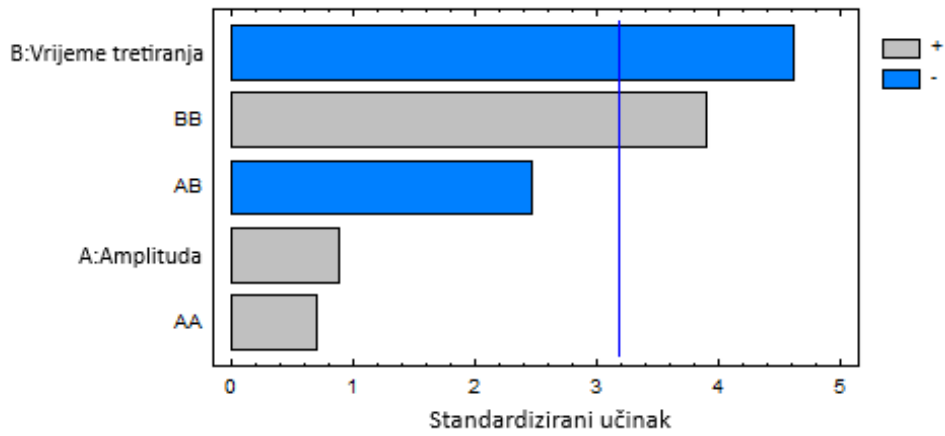
Standardizirani Pareto dijagram za ukupnu promjenu energije



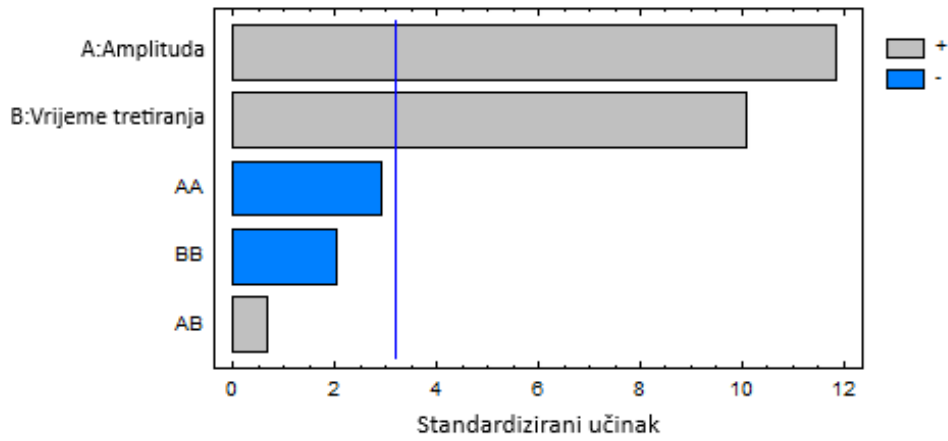
Prilog 3. Grafički prikazi statističke značajnosti utjecaja ulaznih parametara (amplituda, vrijeme tretiranja) i njihovih interakcija na ukupne proteine, ukupne fenole, pH, električnu vodljivost i ukupnu promjenu energije uzorka **LUWI**. AA-kvadratna interakcija amplitude; AB-interakcija amplitude i vremena tretiranja; BB-kvadratna interakcija vremena tretiranja; plava linija-krajnja vrijednost statističke značajnosti utjecaja.



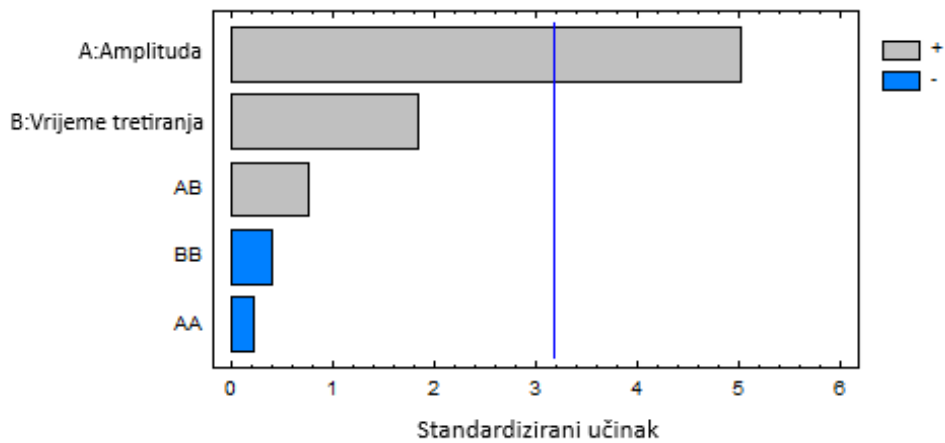
Standardizirani Pareto dijagram za pH



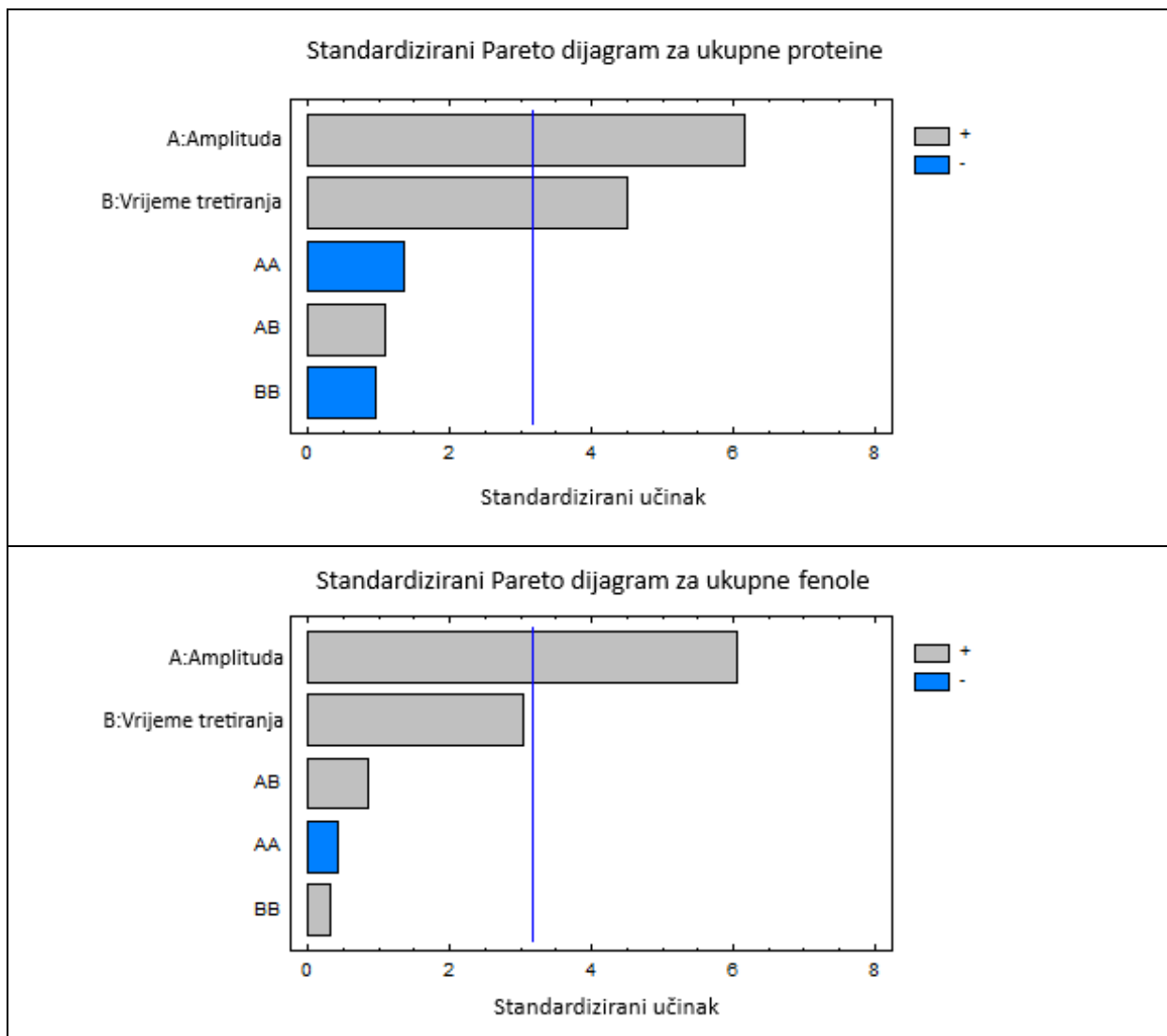
Standardizirani Pareto dijagram za električnu vodljivost



Standardizirani Pareto dijagram za ukupnu promjenu energije

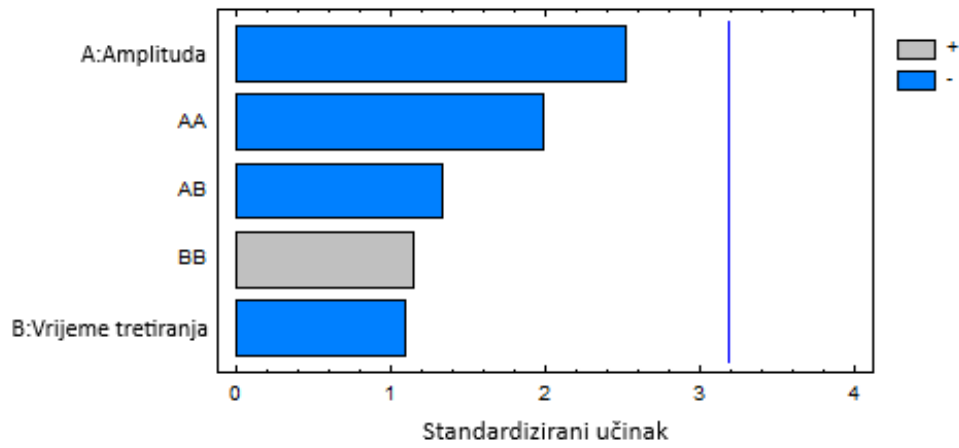


Prilog 4. Grafički prikazi statističke značajnosti utjecaja ulaznih parametara (amplituda, vrijeme tretiranja) i njihovih interakcija na ukupne proteine, ukupne fenole, pH, električnu vodljivost i ukupnu promjenu energije uzorka **LUWW**. AA-kvadratna interakcija amplitude; AB-interakcija amplitude i vremena tretiranja; BB-kvadratna interakcija vremena tretiranja; plava linija-krajnja vrijednost statističke značajnosti utjecaja.

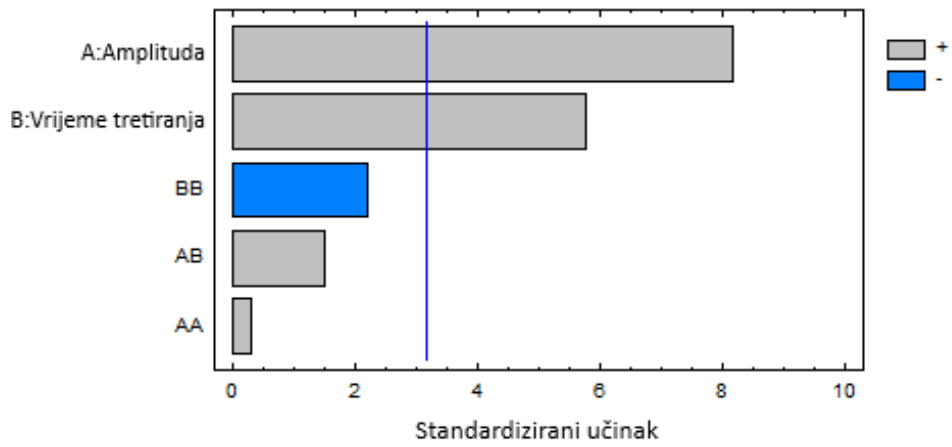




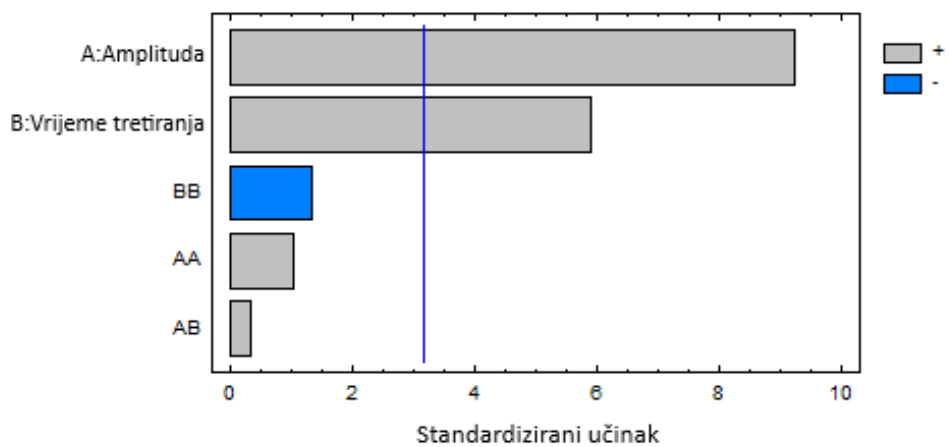
Standardizirani Pareto dijagram za pH



Standardizirani Pareto dijagram za električnu vodljivost



Standardizirani Pareto dijagram za ukupnu promjenu energije



Prilog 5. Tablice analize varijanci (MANOVA) redom za ukupne proteine, ukupne fenole, pH, električnu vodljivost i ukupnu promjenu energije uzorka **LUDI**.

Analiza varijance za ukupne proteine uzorka LUDI					
Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	374,709	1	374,709	80,21	0,0029
B: Vrijeme tretiranja	228,344	1	228,344	48,88	0,0060
AA	295,162	1	295,162	63,18	0,0042
AB	123,559	1	123,559	26,45	0,0142
BB	297,458	1	297,458	63,67	0,0041
Ukupna pogreška	14,0151	3	4,67169	/	/
Ukupno (korelacija)	1333,25	8	/	/	/

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

$R^2 = 98,9488 \%$   
 $R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 97,1968 %  
Standardna pogreška procjene = 2,16141  
Srednja apsolutna pogreška = 1,02503  
Durbin-Watson statistika = 2,28589 (p = 0,2914)  
Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,243566

Analiza varijance za ukupne fenole uzorka LUDI					
Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	8,37461	1	8,37461	7,84	0,0678
B: Vrijeme tretiranja	0,612344	1	0,612344	0,57	0,5040
AA	0,173065	1	0,173065	0,16	0,7142
AB	0,041445	1	0,041445	0,04	0,8564
BB	0,0137077	1	0,0137077	0,01	0,9170
Ukupna pogreška	3,20384	3	1,06795	/	/
Ukupno (korelacija)	12,419	8	/	/	/

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

$R^2 = 74,2021 \%$   
 $R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 31,2057 %  
Standardna pogreška procjene = 1,03341  
Srednja apsolutna pogreška = 0,465572  
Durbin-Watson statistika = 2,62591 (p = 0,6597)  
Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,452375

Analiza varijance za pH uzorka LUDI

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	0,0158107	1	0,0158107	64,06	0,0041
B: Vrijeme tretiranja	0,00190817	1	0,00190817	7,73	0,0690
AA	0,000186889	1	0,000186889	0,76	0,4482
AB	0,001024	1	0,001024	4,15	0,1345
BB	0,000168056	1	0,000168056	0,68	0,4698
Ukupna pogreška	0,000740444	3	0,000246815	/	/
Ukupno (korelacija)	0,0198382	8	/	/	/

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

$R^2 = 96,2676$  %

$R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 90,0469 %

Standardna pogreška procjene = 0,0157103

Srednja apsolutna pogreška = 0,00728395

Durbin-Watson statistika = 2,40591 ( $p = 0,4145$ )

Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,410081

Analiza varijance za električnu vodljivost uzorka LUDI

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	0,056454	1	0,056454	0,83	0,4305
B: Vrijeme tretiranja	0,053016	1	0,053016	0,78	0,4433
AA	0,00493356	1	0,00493356	0,07	0,8056
AB	0,00093025	1	0,00093025	0,01	0,9145
BB	0,000854222	1	0,000854222	0,01	0,9180
Ukupna pogreška	0,205062	3	0,0683538	/	/
Ukupno (korelacija)	0,32125	8	/	/	/

\*utjecaj parametra je statistički značajan ako je  $p < 0,05$

$R^2 = 36,1675$  %

$R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 0,0 %

Standardna pogreška procjene = 0,261446

Srednja apsolutna pogreška = 0,13358

Durbin-Watson statistika = 2,69954 ( $p = 0,7351$ )

Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,406964

Analiza varijance za ukupnu promjenu energije uzorka LUDI

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	0,191745	1	0,191745	0,00	0,9799
B: Vrijeme tretiranja	18,3575	1	18,3575	0,07	0,8062
AA	127,702	1	127,702	0,50	0,5308
AB	20,6116	1	20,6116	0,08	0,7950
BB	283,927	1	283,927	1,11	0,3695
Ukupna pogreška	767,649	3	255,883	/	/
Ukupno (korelacija)	1218,44	8	/	/	/

\*utjecaj parametra je statistički značajan ako je  $p < 0,05$

$R^2 = 36,9973 \%$

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

Standardna pogreška procjene =  $15,9963$

Srednja apsolutna pogreška =  $7,51807$

Durbin-Watson statistika =  $2,51841$  ( $p = 0,5405$ )

Lag 1 rezidualna autokorelacija =  $-0,391381$

Prilog 6. Tablice analize varijanci (MANOVA) redom za ukupne proteine, ukupne fenole, pH, električnu vodljivost i ukupnu promjenu energije uzorka LUDW.

Analiza varijance za ukupne proteine uzorka LUDW					
Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	229,7	1	229,7	134,90	0,0014
B: Vrijeme tretiranja	163,182	1	163,182	95,83	0,0023
AA	0,411726	1	0,411726	0,24	0,6566
AB	39,6597	1	39,6597	23,29	0,0170
BB	73,6228	1	73,6228	43,24	0,0072
Ukupna pogreška	5,10824	3	1,70275	/	/
Ukupno (korelacija)	511,685	8	/	/	/

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

$R^2 = 99,0017 \%$   
 $R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 97,3378 %  
Standardna pogreška procjene = 1,30489  
Srednja apsolutna pogreška = 0,643939  
Durbin-Watson statistika = 2,25311 (p = 0,2612)  
Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,208073

Analiza varijance za ukupne fenole uzorka LUDW					
Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	13,8526	1	13,8526	11,54	0,0425
B: Vrijeme tretiranja	4,50025	1	4,50025	3,75	0,1482
AA	0,735427	1	0,735427	0,61	0,4908
AB	1,18653	1	1,18653	0,99	0,3933
BB	0,122496	1	0,122496	0,10	0,7703
Ukupna pogreška	3,60015	3	1,20005	/	/
Ukupno (korelacija)	23,9975	8	/	/	/

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

$R^2 = 84,9978 \%$   
 $R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 59,9942 %  
Standardna pogreška procjene = 1,09547  
Srednja apsolutna pogreška = 0,56059  
Durbin-Watson statistika = 3,0421 (p = 0,9564)  
Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,613222

Analiza varijance za pH uzorka LUDW

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	0,00904817	1	0,00904817	14,34	0,0323
B: Vrijeme tretiranja	0,00416067	1	0,00416067	6,59	0,0826
AA	0,00228939	1	0,00228939	3,63	0,1529
AB	0,000289	1	0,000289	0,46	0,5470
BB	0,000320889	1	0,000320889	0,51	0,5272
Ukupna pogreška	0,00189278	3	0,000630926	/	/
Ukupno (korelacija)	0,0180009	8	/	/	/

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

$R^2 = 89,4851$  %

$R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) =  $71,9602$  %

Standardna pogreška procjene =  $0,0251182$

Srednja apsolutna pogreška =  $0,0116914$

Durbin-Watson statistika = 2,4451 ( $p = 0,4578$ )

Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,449449

Analiza varijance za električnu vodljivost uzorka LUDW

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	0,0972827	1	0,0972827	7,18	0,0750
B: Vrijeme tretiranja	0,00498817	1	0,00498817	0,37	0,5868
AA	0,183214	1	0,183214	13,53	0,0348
AB	0,133956	1	0,133956	9,89	0,0515
BB	0,0225427	1	0,0225427	1,66	0,2874
Ukupna pogreška	0,0406304	3	0,0135435	/	/
Ukupno (korelacija)	0,482614	8	/	/	/

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

$R^2 = 91,5812$  %

$R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) =  $77,5498$  %

Standardna pogreška procjene =  $0,116376$

Srednja apsolutna pogreška =  $0,0577284$

Durbin-Watson statistika = 2,35844 ( $p = 0,3638$ )

Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,298936

Analiza varijance za ukupnu promjenu energije LUDW

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	802,72	1	802,72	40,78	0,0078
B: Vrijeme tretiranja	81,9573	1	81,9573	4,16	0,1340
AA	15,6313	1	15,6313	0,79	0,4385
AB	2,0512	1	2,0512	0,10	0,7680
BB	54,0291	1	54,0291	2,74	0,1962
Ukupna pogreška	59,0575	3	19,6858	/	/
Ukupno (korelacija)	1015,45	8	/	/	/

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

$R^2 = 94,1841$  %

$R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 84,4909 %

Standardna pogreška procjene = 4,43687

Srednja apsolutna pogreška = 2,25498

Durbin-Watson statistika = 2,20478 ( $p = 0,2199$ )

Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,146869

Prilog 7. Tablice analize varijanci (MANOVA) redom za ukupne proteine, ukupne fenole, pH, električnu vodljivost i ukupnu promjenu energije uzorka LUWI.

Analiza varijance za ukupne proteine uzorka LUWI					
Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	4667,28	1	4667,28	53,73	0,0052
B: Vrijeme tretiranja	2142,55	1	2142,55	24,66	0,0157
AA	428,667	1	428,667	4,93	0,1129
AB	40,5417	1	40,5417	0,47	0,5435
BB	202,476	1	202,476	2,33	0,2243
Ukupna pogreška	260,607	3	86,8691	/	/
Ukupno (korelacija)	7742,12	8	/	/	/

\*utjecaj parametra je statistički značajan ako je  $p < 0,05$ ; statistički značajne vrijednosti označene su crveno  
 $R^2 = 96,6339 \%$   
 $R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) =  $91,0237 \%$   
Standardna pogreška procjene =  $9,32036$   
Srednja apsolutna pogreška =  $4,56053$   
Durbin-Watson statistika =  $1,98058$  ( $p = 0,0829$ )  
Lag 1 rezidualna autokorelacija =  $-0,0730467$

Analiza varijance za ukupne fenole uzorka LUWI					
Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	89,9982	1	89,9982	38,69	0,0084
B: Vrijeme tretiranja	33,1273	1	33,1273	14,24	0,0326
AA	0,385632	1	0,385632	0,17	0,7112
AB	0,866636	1	0,866636	0,37	0,5847
BB	0,27746	1	0,27746	0,12	0,7526
Ukupna pogreška	6,97792	3	2,32597	/	/
Ukupno (korelacija)	131,633	8	/	/	/

\*utjecaj parametra je statistički značajan ako je  $p < 0,05$ ; statistički značajne vrijednosti označene su crveno  
 $R^2 = 94,699 \%$   
 $R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) =  $85,8639 \%$   
Standardna pogreška procjene =  $1,52511$   
Srednja apsolutna pogreška =  $0,771026$   
Durbin-Watson statistika =  $2,25212$  ( $p = 0,2603$ )  
Lag 1 rezidualna autokorelacija =  $-0,15446$



Analiza varijance za pH uzorka LUWI

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	0,000468167	1	0,000468167	0,77	0,4452
B: Vrijeme tretiranja	0,0129735	1	0,0129735	21,30	0,0191
AA	0,000296056	1	0,000296056	0,49	0,5359
AB	0,003721	1	0,003721	6,11	0,0899
BB	0,00929339	1	0,00929339	15,26	0,0298
Ukupna pogreška	0,00182744	3	0,000609148	/	/
Ukupno (korelacija)	0,0285796	8	/	/	/

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

$R^2 = 93,6058 \%$

$R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 82,9487 %

Standardna pogreška procjene = 0,0246809

Srednja apsolutna pogreška = 0,0124938

Durbin-Watson statistika = 3,04756 ( $p = 0,9581$ )

Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,603182

Analiza varijance za električnu vodljivost uzorka LUWI

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	0,0455882	1	0,0455882	139,87	0,0013
B: Vrijeme tretiranja	0,0330042	1	0,0330042	101,26	0,0021
AA	0,00276272	1	0,00276272	8,48	0,0619
AB	0,000144	1	0,000144	0,44	0,5538
BB	0,00136939	1	0,00136939	4,20	0,1328
Ukupna pogreška	0,000977778	3	0,000325926	/	/
Ukupno (korelacija)	0,0838462	8	/	/	/

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

$R^2 = 98,8338 \%$

$R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 96,8903 %

Standardna pogreška procjene = 0,0180534

Srednja apsolutna pogreška = 0,00898765

Durbin-Watson statistika = 2,99 ( $p = 0,9377$ )

Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,565808

Analiza varijance za ukupnu promjenu energije uzorka LUWI

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	6051,63	1	6051,63	25,26	0,0152
B: Vrijeme tretiranja	810,153	1	810,153	3,38	0,1632
AA	12,4484	1	12,4484	0,05	0,8343
AB	137,002	1	137,002	0,57	0,5045
BB	37,2175	1	37,2175	0,16	0,7198
Ukupna pogreška	718,599	3	239,533	/	/
Ukupno (korelacija)	7767,05	8	/	/	/

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

$R^2 = 90,7481$  %

$R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) =  $75,3283$  %

Standardna pogreška procjene =  $15,4769$

Srednja apsolutna pogreška =  $7,91442$

Durbin-Watson statistika = 2,99816 ( $p = 0,9409$ )

Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,609401

Prilog 8. Tablice analize varijanci (MANOVA) redom za ukupne proteine, ukupne fenole, pH, električnu vodljivost i ukupnu promjenu energije uzorka LUWW.

Analiza varijance za ukupne proteine uzorka LUWW					
Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	6064,21	1	6064,21	38,04	0,0086
B: Vrijeme tretiranja	3228,88	1	3228,88	20,25	0,0205
AA	296,562	1	296,562	1,86	0,2659
AB	194,754	1	194,754	1,22	0,3497
BB	146,689	1	146,689	0,92	0,4082
Ukupna pogreška	478,265	3	159,422	/	/
Ukupno (korelacija)	10409,4	8	/	/	/

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

$R^2 = 95,4054 \%$   
 $R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 87,7478 %  
Standardna pogreška procjene = 12,6262  
Srednja apsolutna pogreška = 6,36695  
Durbin-Watson statistika = 2,22283 (p = 0,2348)  
Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,137688

Analiza varijance za ukupne fenole uzorka LUWW					
Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	86,5314	1	86,5314	36,64	0,0090
B: Vrijeme tretiranja	21,88	1	21,88	9,26	0,0557
AA	0,45135	1	0,45135	0,19	0,6915
AB	1,70677	1	1,70677	0,72	0,4577
BB	0,244999	1	0,244999	0,10	0,7685
Ukupna pogreška	7,08499	3	2,36166	/	/
Ukupno (korelacija)	117,899	8	/	/	/

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

$R^2 = 93,9907 \%$   
 $R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 83,9751 %  
Standardna pogreška procjene = 1,53677  
Srednja apsolutna pogreška = 0,702252  
Durbin-Watson statistika = 2,72575 (p = 0,7601)  
Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,406908

Analiza varijance za pH uzorka LUWW

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	0,0042135	1	0,0042135	6,34	0,0864
B: Vrijeme tretiranja	0,0007935	1	0,0007935	1,19	0,3545
AA	0,00261606	1	0,00261606	3,94	0,1415
AB	0,00119025	1	0,00119025	1,79	0,2732
BB	0,000868056	1	0,000868056	1,31	0,3361
Ukupna pogreška	0,00199419	3	0,000664731	/	/
Ukupno (korelacija)	0,0116756	8	/	/	/

\*utjecaj parametra je statistički značajan ako je  $p < 0,05$

$R^2 = 82,9199 \%$

$R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) =  $54,4531 \%$

Standardna pogreška procjene =  $0,0257824$

Srednja apsolutna pogreška =  $0,0119321$

Durbin-Watson statistika =  $2,52265$  ( $p = 0,5453$ )

Lag 1 rezidualna autokorelacija =  $-0,473827$

Analiza varijance za električnu vodljivost uzorka LUWW

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	0,051894	1	0,051894	66,63	<b>0,0038</b>
B: Vrijeme tretiranja	0,0258727	1	0,0258727	33,22	<b>0,0104</b>
AA	0,0000642222	1	0,0000642222	0,08	0,7927
AB	0,001764	1	0,001764	2,26	0,2294
BB	0,00375556	1	0,00375556	4,82	0,1156
Ukupna pogreška	0,00233644	3	0,000778815	/	/
Ukupno (korelacija)	0,0856869	8	/	/	/

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

$R^2 = 97,2733 \%$

$R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) =  $92,7287 \%$

Standardna pogreška procjene =  $0,0279073$

Srednja apsolutna pogreška =  $0,0141481$

Durbin-Watson statistika =  $2,13168$  ( $p = 0,1653$ )

Lag 1 rezidualna autokorelacija =  $-0,0914389$

Analiza varijance za ukupnu promjenu energije uzorka LUWW

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*
A: Amplituda	2733,9	1	2733,9	85,49	0,0027
B: Vrijeme tretiranja	1119,1	1	1119,1	35,00	0,0096
AA	33,6665	1	33,6665	1,05	0,3804
AB	3,87027	1	3,87027	0,12	0,7509
BB	57,7924	1	57,7924	1,81	0,2715
Ukupna pogreška	95,9327	3	31,9776	/	/
Ukupno (korelacija)	4044,26	8	/	/	/

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

$R^2 = 97,6279$  %

$R^2$  (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 93,6745 %

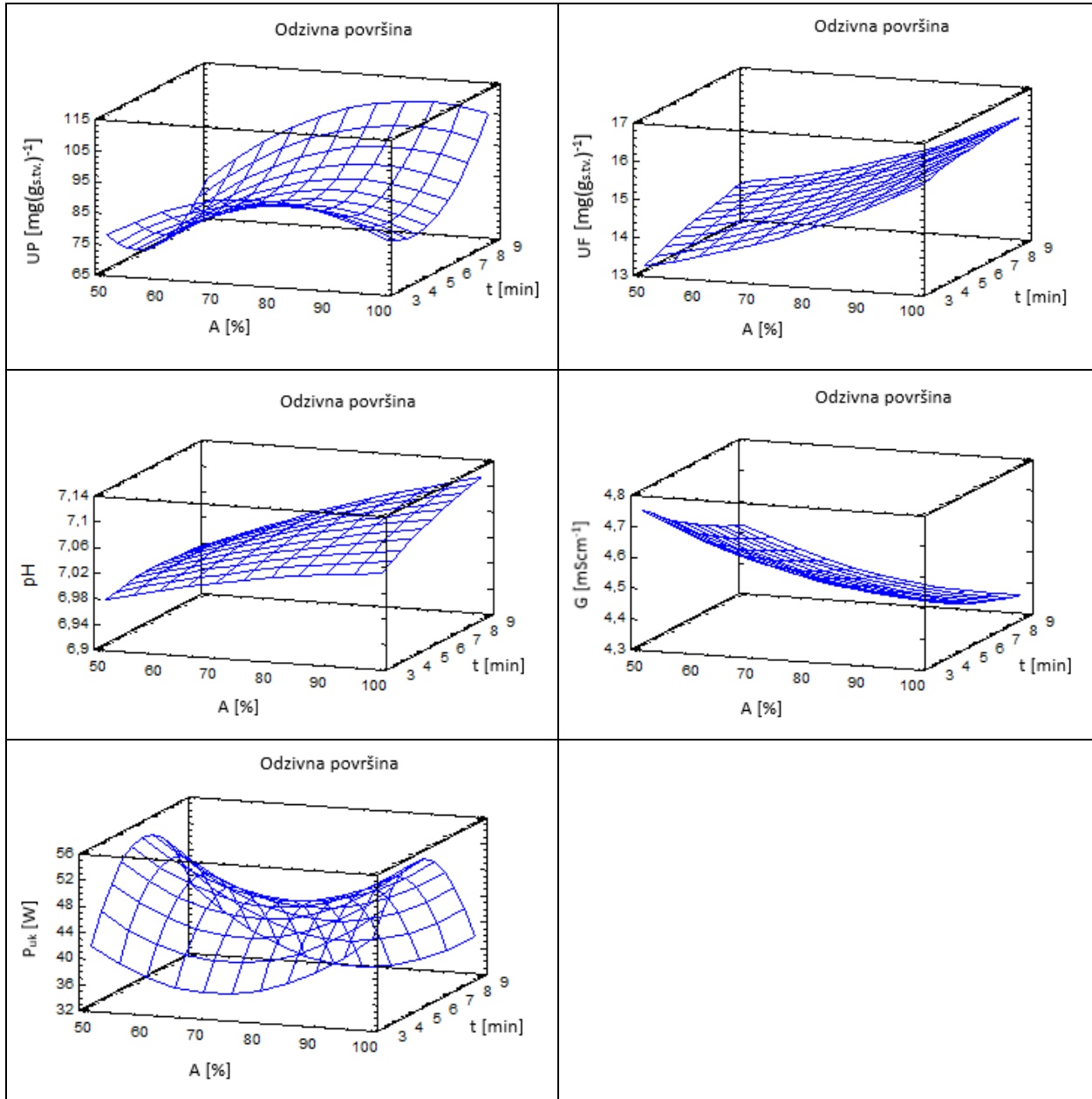
Standardna pogreška procjene = 5,65487

Srednja apsolutna pogreška = 2,78992

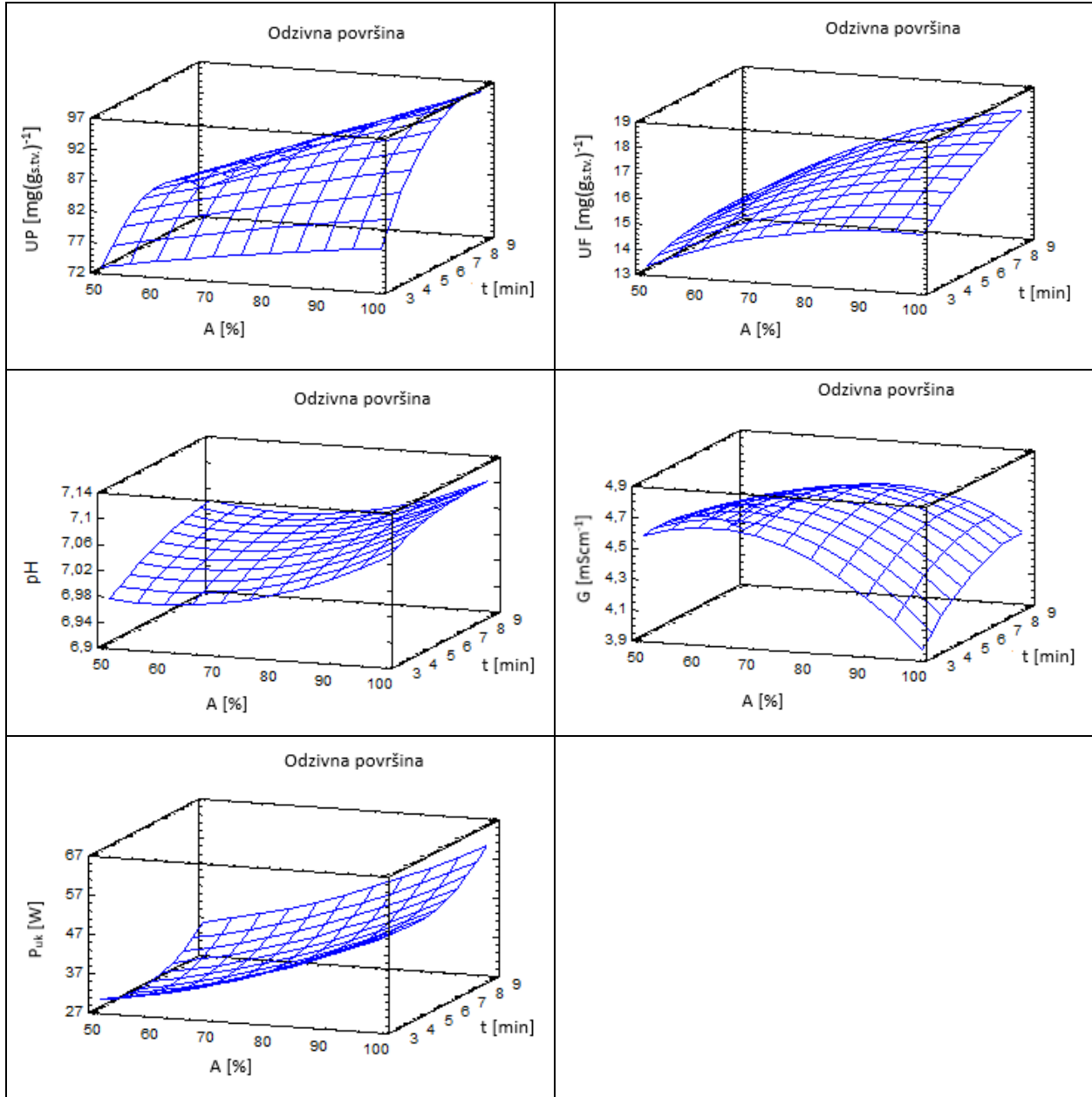
Durbin-Watson statistika = 2,64708 ( $p = 0,6821$ )

Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,387489

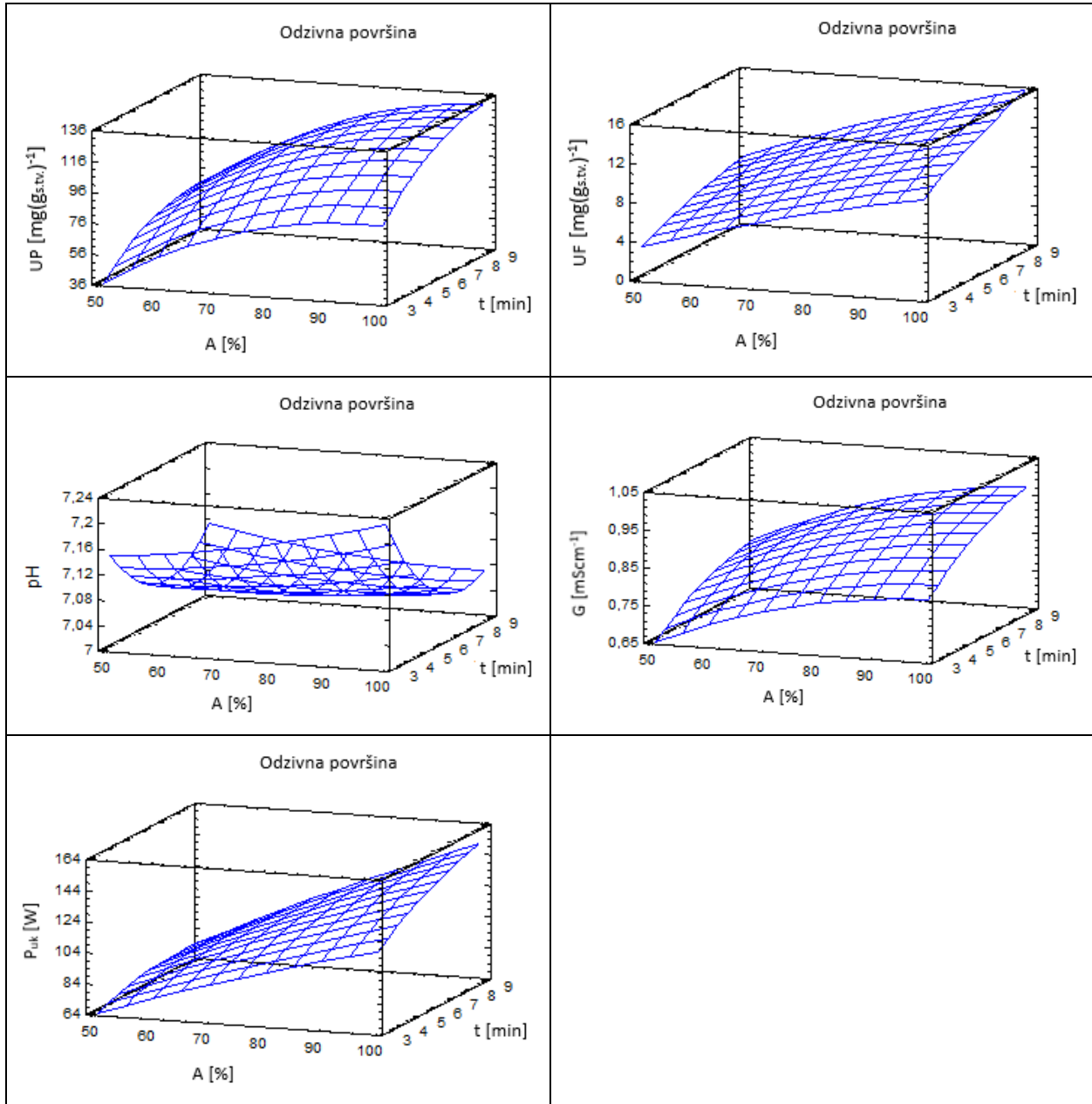
Prilog 9. Trodimenzionalni dijagrami odzivne površine za ukupne proteine, ukupne fenole, pH, električnu vodljivost i ukupnu promjenu energije uzorka **LUDI**. A-amplituda; *t*-vrijeme tretiranja; UP-ukupni proteini; UF-ukupni fenoli; *G*-električna vodljivost;  $P_{uk}$ -ukupna promjena energije.



Prilog 10. Trodimenzionalni dijagrami odzivne površine za ukupne proteine, ukupne fenole, pH, električnu vodljivost i ukupnu promjenu energije uzorka **LUDW**. A-amplituda; *t*-vrijeme tretiranja; UP-ukupni proteini; UF-ukupni fenoli; *G*-električna vodljivost;  $P_{uk}$ -ukupna promjena energije.

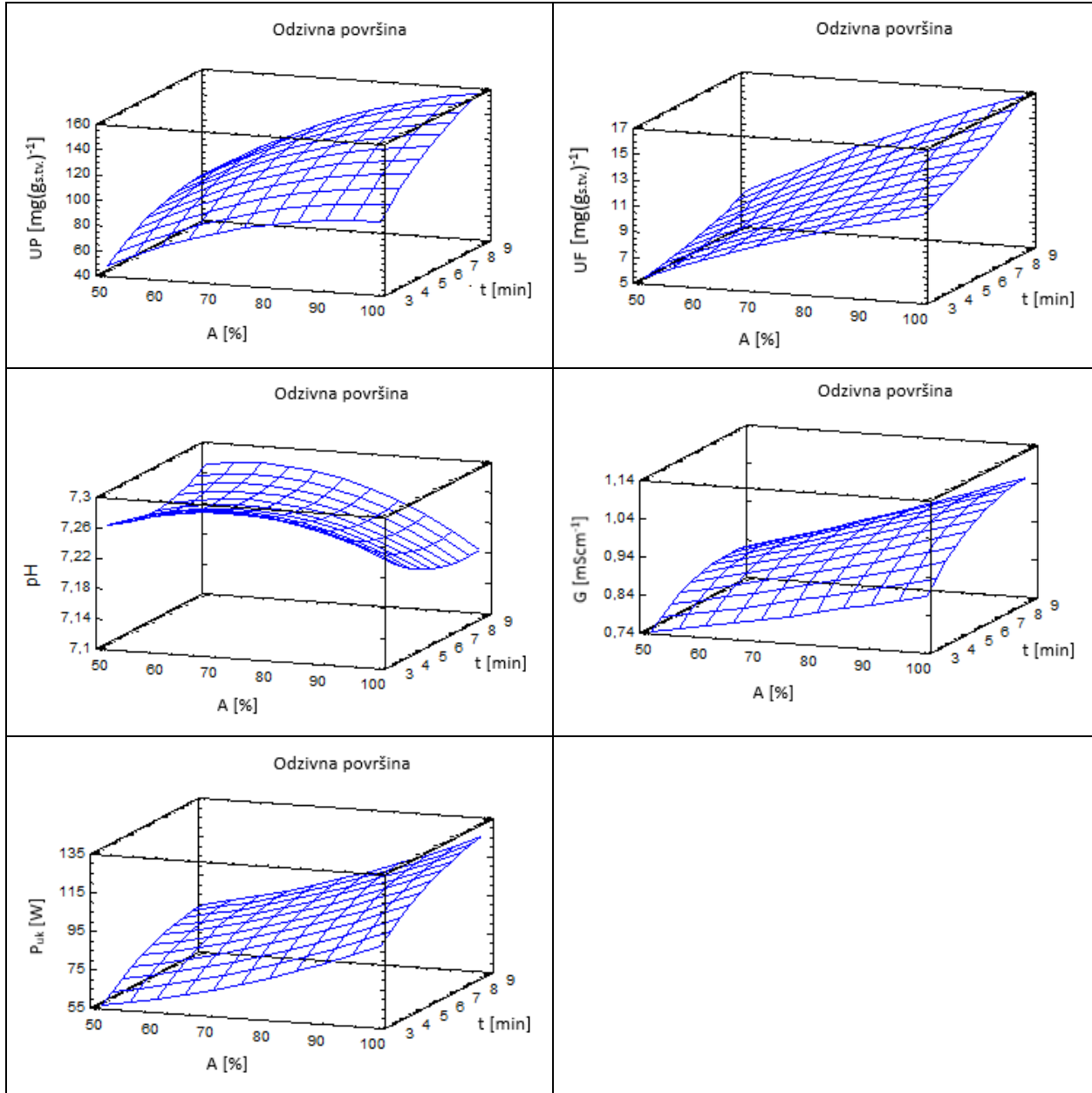


Prilog 11. Trodimenzionalni dijagrami odzivne površine za ukupne proteine, ukupne fenole, pH, električnu vodljivost i ukupnu promjenu energije uzorka **LUWI**. A-amplituda; *t*-vrijeme tretiranja; UP-ukupni proteini; UF-ukupni fenoli; *G*-električna vodljivost;  $P_{uk}$ -ukupna promjena energije.





Prilog 12. Trodimenzionalni dijagrami odzivne površine za ukupne proteine, ukupne fenole, pH, električnu vodljivost i ukupnu promjenu energije uzorka **LUWW**. A-amplituda; *t*-vrijeme tretiranja; UP-ukupni proteini; UF-ukupni fenoli; *G*-električna vodljivost;  $P_{uk}$ -ukupna promjena energije.



Prilog 13. Jednadžbe regresije za ukupne proteine, ukupne fenole, pH, električnu vodljivost i ukupnu promjenu energije uzorka LUDI, LUDW, LUWI i LUWW. A-amplituda; B-vrijeme tretiranja; UP-ukupni proteini; UF-ukupni fenoli; G-električna vodljivost;  $P_{uk}$ -ukupna promjena energije (uz vrijednosti varijabli u njihovim izvornim mjernim jedinicama).

Jednadžba regresije za ukupne proteine uzorka <b>LUDI</b> : $UP = 22,7311 + 2,78707 \cdot A - 19,7621 \cdot B - 0,0194373 \cdot A^2 + 0,0741046 \cdot A \cdot B + 1,35505 \cdot B^2$
Jednadžba regresije za ukupne fenole uzorka <b>LUDI</b> : $UF = 12,1573 - 0,0151991 \cdot A + 0,318662 \cdot B + 0,000470663 \cdot A^2 - 0,0013572 \cdot A \cdot B - 0,00919865 \cdot B^2$
Jednadžba regresije za pH uzorka <b>LUDI</b> : $pH = 6,83178 + 0,00309333 \cdot A + 0,00216667 \cdot B - 0,0000154667 \cdot A^2 + 0,000213333 \cdot A \cdot B - 0,00101852 \cdot B^2$
Jednadžba regresije za električnu vodljivost uzorka <b>LUDI</b> : $G = 5,57206 - 0,01702 \cdot A - 0,0741389 \cdot B + 0,0000794667 \cdot A^2 + 0,000203333 \cdot A \cdot B + 0,0022963 \cdot B^2$
Jednadžba regresije za ukupnu promjenu energije uzorka <b>LUDI</b> : $P_{uk} = 60,7484 - 1,74331 \cdot A + 17,5734 \cdot B + 0,0127851 \cdot A^2 - 0,0302667 \cdot A \cdot B - 1,32387 \cdot B^2$
Jednadžba regresije za ukupne proteine uzorka <b>LUDW</b> : $UP = 49,178 + 0,104484 \cdot A + 6,67921 \cdot B - 0,000725954 \cdot A^2 + 0,041984 \cdot A \cdot B - 0,674138 \cdot B^2$
Jednadžba regresije za ukupne fenole uzorka <b>LUDW</b> : $UF = 6,56563 + 0,162742 \cdot A + 0,0740219 \cdot B - 0,00097023 \cdot A^2 + 0,00726185 \cdot A \cdot B - 0,0274982 \cdot B^2$
Jednadžba regresije za pH uzorka <b>LUDW</b> : $pH = 7,06044 - 0,00588667 \cdot A + 0,0341667 \cdot B + 0,0000541333 \cdot A^2 - 0,000113333 \cdot A \cdot B - 0,00140741 \cdot B^2$
Jednadžba regresije za električnu vodljivost uzorka <b>LUDW</b> : $G = 2,97978 + 0,0529067 \cdot A - 0,0318333 \cdot B - 0,000484267 \cdot A^2 + 0,00244 \cdot A \cdot B - 0,0117963 \cdot B^2$
Jednadžba regresije za ukupnu promjenu energije uzorka <b>LUDW</b> : $P_{uk} = 44,9075 - 0,265579 \cdot A - 6,41421 \cdot B + 0,00447304 \cdot A^2 + 0,009548 \cdot A \cdot B + 0,577506 \cdot B^2$

<p>Jednadžba regresije za ukupne proteine uzorka <b>LUWI</b>:</p> $UP = -169,34 + 4,37456 \cdot A + 16,5309 \cdot B - 0,0234242 \cdot A^2 + 0,0424483 \cdot A \cdot B - 1,11797 \cdot B^2$
<p>Jednadžba regresije za ukupne fenole uzorka <b>LUWI</b>:</p> $UF = -8,93973 + 0,223066 \cdot A + 0,814396 \cdot B - 0,000702573 \cdot A^2 + 0,00620622 \cdot A \cdot B - 0,041385 \cdot B^2$
<p>Jednadžba regresije za pH uzorka <b>LUWI</b>:</p> $pH = 7,32689 - 0,000126667 \cdot A - 0,0758889 \cdot B + 0,0000194667 \cdot A^2 - 0,000406667 \cdot A \cdot B + 0,00757407 \cdot B^2$
<p>Jednadžba regresije za električnu vodljivost uzorka <b>LUWI</b>:</p> $G = 0,0567778 + 0,0119267 \cdot A + 0,0536111 \cdot B - 0,0000594667 \cdot A^2 + 0,00008 \cdot A \cdot B - 0,00290741 \cdot B^2$
<p>Jednadžba regresije za ukupnu promjenu energije uzorka <b>LUWI</b>:</p> $P_{uk} = -14,0001 + 1,40091 \cdot A + 3,77266 \cdot B - 0,00399173 \cdot A^2 + 0,078032 \cdot A \cdot B - 0,479309 \cdot B^2$
<p>Jednadžba regresije za ukupne proteine uzorka <b>LUWW</b>:</p> $UP = -127,521 + 3,63594 \cdot A + 12,1738 \cdot B - 0,0194833 \cdot A^2 + 0,0930363 \cdot A \cdot B - 0,951571 \cdot B^2$
<p>Jednadžba regresije za ukupne fenole uzorka <b>LUWW</b>:</p> $UF = -3,55671 + 0,21366 \cdot A - 0,483342 \cdot B - 0,000760084 \cdot A^2 + 0,00870957 \cdot A \cdot B + 0,0388888 \cdot B^2$
<p>Jednadžba regresije za pH uzorka <b>LUWW</b>:</p> $pH = 7,01428 + 0,009 \cdot A - 0,0143611 \cdot B - 0,0000578667 \cdot A^2 - 0,00023 \cdot A \cdot B + 0,00231481 \cdot B^2$
<p>Jednadžba regresije za električnu vodljivost uzorka <b>LUWW</b>:</p> $G = 0,509556 + 0,00068 \cdot A + 0,0586667 \cdot B + 0,00000906667 \cdot A^2 + 0,00028 \cdot A \cdot B - 0,00481481 \cdot B^2$
<p>Jednadžba regresije za ukupnu promjenu energije uzorka <b>LUWW</b>:</p> $P_{uk} = 21,0889 - 0,209533 \cdot A + 10,7361 \cdot B + 0,00656453 \cdot A^2 + 0,0131153 \cdot A \cdot B - 0,59728 \cdot B^2$

Prilog 14. Rezultati optimizacije ulaznih parametara za maksimalne izlazne vrijednosti ukupnih proteina, ukupnih fenola, pH, električne vodljivosti i ukupne promjene energije za uzorak **LUDI**.

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	88,8589
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0
Cilj: maksimizirati vrijednost <b>ukupnih proteina</b> Optimalna vrijednost = 108,076 mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup>			

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0
Cilj: maksimizirati vrijednost <b>ukupnih fenola</b> Optimalna vrijednost = 16,2454 mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup>			

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0
Cilj: maksimizirati <b>pH</b> vrijednost Optimalna vrijednost = 7,11544			

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	50,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	3,0
Cilj: maksimizirati vrijednost <b>električne vodljivosti</b> Optimalna vrijednost = 4,74847 mS cm <sup>-1</sup>			

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	50,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	6,0661
Cilj: maksimizirati vrijednost <b>ukupne promjene energije</b> Optimalna vrijednost = 54,2522 W			

Prilog 15. Rezultati optimizacije ulaznih parametara za maksimalne izlazne vrijednosti ukupnih proteina, ukupnih fenola, pH, električne vodljivosti i ukupne promjene energije za uzorak LUDW.

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	8,06691
Cilj: maksimizirati vrijednost <b>ukupnih proteina</b> Optimalna vrijednost = 96,246 mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup>			

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0
Cilj: maksimizirati vrijednost <b>ukupnih fenola</b> Optimalna vrijednost = 18,112 mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup>			

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	8,11352
Cilj: maksimizirati <b>pH</b> vrijednost Optimalna vrijednost = 7,10572			

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	69,2823
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	5,8162
Cilj: maksimizirati vrijednost <b>električne vodljivosti</b> Optimalna vrijednost = 4,7198 mS cm <sup>-1</sup>			

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0
Cilj: maksimizirati vrijednost <b>ukupne promjene energije</b> Optimalna vrijednost = 60,7233 W			

Prilog 16. Rezultati optimizacije ulaznih parametara za maksimalne izlazne vrijednosti ukupnih proteina, ukupnih fenola, pH, električne vodljivosti i ukupne promjene energije za uzorak **LUWI**.

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0
Cilj: maksimizirati vrijednost <b>ukupnih proteina</b> Optimalna vrijednost = 130,301 mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup>			

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0
Cilj: maksimizirati vrijednost <b>ukupnih fenola</b> Optimalna vrijednost = 15,9042 mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup>			

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	3,0
Cilj: maksimizirati <b>pH</b> vrijednost Optimalna vrijednost = 7,22739			

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0
Cilj: maksimizirati vrijednost <b>električne vodljivosti</b> Optimalna vrijednost = 0,973778 mS cm <sup>-1</sup>			

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0
Cilj: maksimizirati vrijednost <b>ukupne promjene energije</b> Optimalna vrijednost = 151,532 W			

Prilog 17. Rezultati optimizacije ulaznih parametara za maksimalne izlazne vrijednosti ukupnih proteina, ukupnih fenola, pH, električne vodljivosti i ukupne promjene energije za uzorak **LUWW**.

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0
Cilj: maksimizirati vrijednost <b>ukupnih proteina</b> Optimalna vrijednost = 157,46 mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup>			

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0
Cilj: maksimizirati vrijednost <b>ukupnih fenola</b> Optimalna vrijednost = 16,847 mg (g <sub>s.tv.</sub> ) <sup>-1</sup>			

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	71,7633
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	3,0
Cilj: maksimizirati <b>pH</b> vrijednost Optimalna vrijednost = 7,29037			

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0
Cilj: maksimizirati vrijednost <b>električne vodljivosti</b> Optimalna vrijednost = 1,05822 mS cm <sup>-1</sup>			

<b>Faktor</b>	<b>Najmanje vrijednosti</b>	<b>Najveće vrijednosti</b>	<b>Optimalne vrijednosti</b>
Amplituda	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0
Cilj: maksimizirati vrijednost <b>ukupne promjene energije</b> Optimalna vrijednost = 125,83 W			

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Matea Hunić izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis