

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija biološko aktivnih komponenti iz lista šećerne repe

Šarić, Nina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:230376>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-07**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Nina Šarić
0058219835**

**ULTRAZVUČNO POTPOMOĞNUTA EKSTRAKCIJA
BIOLOŠKI AKTIVNIH KOMPONENTI IZ LISTA
ŠEĆERNE REPE**

ZAVRŠNI RAD

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

Mentor: prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Zagreb, 2023.

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

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za opće programe
Laboratorij za održivi razvoj

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija biološko aktivnih komponenti iz lista šećerne repe

Nina Šarić, 0058219835

Sažetak:

Primjenom ultrazvuka i toplinskog tretmana, ekstrahirani su ukupni proteini i polifenoli iz sušenih listova šećerne repe uz otopinu pepela i vode kao ekstrakcijsko otapalo. Koncentracije ukupnih proteina i polifenola određene su spektrofotometrijskim metodama. Ekstraktima je također određena i antioksidacijska aktivnost FRAP i DPPH metodom, električna vodljivost i pH vrijednost. Najviši prinos ukupnih proteina je $120,12 \pm 1,94$ mg BSA/g s.t.v. pri amplitudi od 50% i vremenu tretiranja od 9 minuta. Statističkom obradom u programu STATGRAPHICS ispitan je utjecaj amplitude i vremena tretiranja na ukupne proteine i polifenole, antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP i DPPH metodom, pH i električnu vodljivost. Utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) vremena tretiranja na izlazne vrijednosti ukupnih proteina, ukupnih polifenola, pH te električnu vodljivost. Utjecaj vremena tretiranja toplinske ekstrakcije na izlazne parametre, ispitan analizom varijance, statistički je značajan za izlazne vrijednosti ukupnih proteina, polifenola, vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene FRAP i DPPH metodom.

Ključne riječi: ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija, list šećerne repe, proteini, polifenoli, toplinska ekstrakcija

Rad sadrži: 35 stranica, 17 slika, 11 tablica, 21 literaturnih navoda, 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Pomoć pri izradi: Josipa Dukić, mag. ing.

Datum obrane: 8. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of General Programmes
Laboratory for Sustainable development

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Ultrasound-assisted extraction of biologically active components from sugar beet leaves

Nina Šarić, 0058219835

Abstract:

By means of high-power ultrasound and heat treatment, total proteins and polyphenols were extracted from dried sugar beet leaves with a solution composed of ash and water as solvent. Concentrations of total proteins and polyphenols were measured using spectrophotometric methods. In the obtained extracts, antioxidant activity (DPPH and FRAP method), pH value and electrical conductivity were also determined. The highest yield of total proteins was 120.12 ± 1.94 mg BSA/g_{s.t.v.} at an amplitude of 50% and a treatment time of 9 minutes. Statistical analysis in the STATGRAPHICS program examined the effect of amplitude and treatment time on total proteins, polyphenols, antioxidant activity, pH and electrical conductivity. A statistically significant influence ($p < 0,05$) of the treatment time on the output values of total proteins, polyphenols, pH and electrical conductivity was determined. The influence of thermal extraction treatment time on the output parameters, examined by analysis of variance, is statistically significant for total proteins, polyphenols, and the value of antioxidant activity.

Keywords: ultrasound assisted extraction, proteins, polyphenols, sugar beet leaf, thermal extraction

Thesis contains: 35 pages, 17 figures, 11 tables, 21 references, 2 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Anet Režek Jambrak, PhD

Technical support and assistance: Josipa Dukić, MSc

Thesis defended: September 8, 2023

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. LIST ŠEĆERNE REPE.....	2
2.1.1. Proteini lista šećerne repe.....	3
2.1.2. Polifenolni spojevi lista šećerne repe.....	3
2.2. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM (ULTRASOUND ASSISTED EXTRACION – UAE).....	4
2.2.1. Ultrazvuk – zelena tehnologija.....	4
2.2.2. Mehanizam djelovanja UAE.....	5
2.2.3. Parametri koji utječu na UAE.....	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO	8
3.1. MATERIJALI.....	8
3.1.1. List šećerne repe.....	8
3.1.2. Kemikalije.....	8
3.1.3. Uređaji.....	9
3.1.4. Laboratorijsko posuđe.....	10
3.2. METODE.....	11
3.2.1. Ultrazvučna ekstrakcija visokog intenziteta.....	11
3.2.2. Toplinska ekstrakcija.....	12
3.2.3. Određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom po Lowry-ju.....	12
3.2.4. Određivanje udjela ukupnih polifenolnih spojeva.....	14
3.2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom.....	16
3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	17
3.2.7. Određivanje suhe tvari sušenjem do konstante mase.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. REZULTATI PARAMETARA MJERENIH NAKON PROVEDENIH EKSTRAKCIJA.....	20
4.2. REZULTATI STATISTIČKE OBRADE PODATAKA EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE ULTRAZVUKOM.....	23
4.3. REZULTATI STATISTIČKE OBRADE PODATAKA TOPLINKSE EKSTRAKCIJE.....	32
5. ZAKLJUČCI	33
6. POPIS LITERATURE	34

1. UVOD

Povijesno gledano, otpad iz prehrambenog lanca uglavnom se iskorištavao u proizvodnji stočne hrane te se tek u posljednjim desetljećima počeo smatrati resursom koji treba valorizirati i u drugim industrijskim kontekstima i preraditi u komercijalno vrijedne proizvode (Tenorio, 2017.). Za većinu industrijaliziranih usjeva, beru se i prerađuju samo određeni dijelovi biljaka dok se listovi ostavljaju neiskorišteni, kao što je i u slučaju šećerne repe. Odbačeno lišće šećerne repe producira tone biomase godišnje koji imaju potencijal u prehrambenoj i kemijskoj industriji. Stoga bi zbog adekvatnog nutritivnog sastava, lišće šećerne repe moglo biti dobar izvor visokovrijednih spojeva za primjenu u hrani, a proizvodnja bi održavala revalorizaciju agroindustrijskog otpada (Akyüz i Ersus, 2021.).

Odabir odgovarajuće metode ekstrakcije još je jedan ključni čimbenik za postizanje visokih prinosa bioaktivnih spojeva. Budući da konvencionalne metode ekstrakcije imaju mnoge nedostatke, a također se javlja sve veći interes korištenja „zelene tehnologije“, atraktivna alternativa je metoda ekstrakcije potpomognuta ultrazvukom. Korištenje ultrazvuka u ekstrakciji u posljednje se vrijeme naširoko istražuje, a broj radova objavljenih u posljednja dva desetljeća eksponencijalno je porastao. Ultrazvuk ima nekoliko prednosti u smislu skraćivanja vremena procesa, smanjenja volumena otapala i povećanja prinosa željenih komponenti u usporedbi s konvencionalnim metodama ekstrakcije (Prado i Rostagno, 2022.).

Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnosti iskorištavanja listova šećerne repe, s obzirom na njihovu veliku dostupnost kao otpada prehrambene industrije. Eksperimentalni dio rada ima nekoliko ciljeva koji se odnose na usporedbu ekstrakcije potpomognute ultrazvukom s toplinskom ekstrakcijom s obzirom na različite uvjete tretmana, spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ukupnih proteina i polifenola te određivanje antioksidacijske aktivnosti u dobivenim ekstraktima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LIST ŠEĆERNE REPE

Šećerna repa (*Beta vulgaris L.*), iz porodice *Amaranthaceae*, je dvogodišnja biljka koja raste u umjerenim klimatskim zonama i na neutralnim tlima (Maravić i sur. 2022.). Jedna je od najvažnijih kultura, uz trsku, za proizvodnju šećera u Europi, a danas se u Europi proizvodi 120 milijuna tona repe iz koje se ekstrahira oko 16 milijuna tona šećera što čini 50% europske proizvodnje šećera (Caliceti i sur. 2022.).

U prvoj godini klijanja šećerne repe dovodi do razvoja rozete golih, tamnozelenih, sjajnih listova s istaknutim srednjim žilama i jakim peteljka (Elliot i Weston, 1993.). Ti listovi (slika 1) mogu biti ovalnog do srcolikog oblika, neravne su površine te mogu imati oble ili zašiljene vrhove. Rast i zrenje lišća nastavlja dok korijen bubri i nakuplja saharozu. Korijeni se zatim obično beru prije početka zimskih mrazeva dajući do 15 t šećera/ha od 83 t korijena, a ostaje oko 45 tona lisnog i stabličnog materijala (van Krimpen i sur., 2013.).



Slika 1. Lišće šećerne repe (Edde, 2021.)

Budući da je cilj uzgoja šećerne repe proizvodnja rafiniranog šećera, korijen ide na daljnju preradu, dok lišće koje čini 20-34% biljke ostaje na poljima uglavnom neiskorišteno kao otpad. Međutim, listovi šećerne repe su bogati esencijalnim aminokiselinama i masnim kiselinama te proteinima i polifenolima i zbog toga se mogu smatrati moćnim izvorom bioaktivnih spojeva (Ebrahimi i sur., 2022.).

2.1.1. Proteini lista šećerne repe

Zeleno lišće smatra se nedovoljno iskorištenim izvorom proteina za primjenu u hrani. Zabilježeno je da lišće šećerne repe sadrži prosječno 22,8% sirovih proteina u suhoj tvari što znači da je u lišću prisutno oko 400-600 kg/ha proteina, a ova vrijednost je prilično usporediva s proizvodnjom proteina soje (450-600 kg/ha) i žitarica (570 kg/ha) (van Krimpen i sur., 2013.).

Što se tiče vrste proteina, proteini lista sastoje se od topljivih i netopljivih proteina. Ekstrakcija proteina iz lista šećerne repe usmjerene su na izdvajanje topljivih proteina koji čini oko polovicu proteina lista i to je poželjna frakcija za ljudsku hranu zbog svoje bijele boje i nedostatka neugodnog okusa (Barbeau i Kinsella, 1988). Enzim ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (RuBisCO) čini većinu topljivih proteina i može se pročistiti iz frakcije topljivih proteina lista. Tijekom proizvodnje koncentrata lisnih proteina konačni prinos proteina obično je 40 do 60% ukupnog proteina lista (Bals i sur., 2012.) Rezultati ograničenih istraživanja pokazuju da RuBisCO posjeduje neka poželjna funkcionalna svojstva za prehrambenu industriju: topiv je u pH rasponu većine prehrambenih sustava (6-8), stvara stabilne pjene i emulzije na niskoj temperaturi te kada se zagriju RuBisCO otopine stvaraju čvrste gelove (Barbeau i Kinsella, 1988).

Netopiva frakcija proteina se uglavnom sastoji od membranskih proteina u membranama kloroplasta (tj. tilakoidnim membranama), gdje su povezani s klorofilom, karotenoidima i lipidima (Tenorio, 2017.). Osim zelene boje, proteini lisne membrane se do sada ne koriste u prehrani zbog njihove lošije nutritivne kvalitete u usporedbi s topljivim proteinima u pogledu profila aminokiselina i prisutnosti antinutritivnih spojeva (Tenorio, 2017.). Zbog toga je dosadašnji razvoj procesa ekstrakcije proteina iz lišća bio je usmjeren na topivu frakciju proteina, ostavljajući netopljivu frakciju u sporednim tokovima.

2.1.2. Polifenolni spojevi lista šećerne repe

Polifenoli su spojevi koji posjeduju jedan ili više aromatskih prstenova s jednom ili više hidroksilnih skupina, a široko su rasprostranjeni u biljnom carstvu (Maravić i sur., 2022.). Uz njihovu sveprisutnost u svim biljnim organima kao sekundarnim biljnim metaboliti, također su sastavni dio ljudske prehrane (Dai i Mumper, 2010.). Biljni fenoli općenito su uključeni u

obranu biljaka od UV zračenja ili agresije od strane patogena, parazita i grabežljivaca, kao i doprinos bojama biljaka. Polifenoli koji se nalaze u biljkama iz porodice *Amaranthaceae*, kojoj pripada i šećerna repa, mogu se podijeliti na fenolne kiseline (npr. hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina) i flavonoide od kojih su najzastupljeniji flavonoli (npr. kvercetin) i flavoni (npr. viteksin) (Vissers i sur. 2017). Svojstva koja pokazuju polifenoli su od interesa za proizvodnju funkcionalnih proizvoda povećavajući njihovu antioksidacijsku aktivnost i poboljšavajući njihove biološke dobrobiti (Esclapez u sur., 2011.).

Polifenolni spojevi djeluju kao antioksidansi na način da smanjuju stvaranje slobodnih radikala te također neutraliziraju nastale slobodne radikale. Antioksidativno djelovanje uvelike je povezano s količinom polifenola. Međutim, treba napomenuti da je vrsta i kvaliteta fenolnih spojeva odgovornija za količinu antioksidativnog djelovanja nego njihova količina. Nadalje, utvrđeno je da polifenolni spojevi moduliraju aktivnost širokog spektra enzima i staničnih receptora (Dai i Mumper 2010.). Na taj način, osim što imaju antioksidativna svojstva, polifenoli imaju još nekoliko specifičnih bioloških djelovanja u prevenciji i/ili liječenju raznih bolesti. Lorizola i sur. (2018.) istraživali su utjecaj fenolnih spojeva iz lišća šećerne repe na oksidativno oštećenje jetre kod miševa hranjenih hranom s visokim udjelom masti i izvijestili su da su sušeni listovi umanjili štetne učinke ovakve prehrane na metabolizam lipida, snizili razinu glukoze i kolesterola u krvi te smanjili aktivnosti glutacion peroksidaze i glutacion reduktaze u miševa. Štoviše, konzumacija lišća šećerne repe mogla bi biti korisna zbog njihovog visokog sadržaja polifenola budući da polifenoli mogu inhibirati acetilkolinesterazu, enzim povezan s razvojem Alzheimerove bolesti na način da povećavaju razinu acetilkolina u mozgu (Maravić i sur., 2022.). Zbog ovakvih mnogih korisnih svojstava, kao što su antioksidativna, antibakterijska i antikancerogena svojstva, u posljednjem desetljeću došlo je do povećanog interesa za razvoj ekstrakcijskih metoda polifenolnih spojeva.

2.2.EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM (Ultrasound assisted extracion – UAE)

2.2.1. Ultrazvuk – zelena tehnologija

Ultrazvuk je mehanički val koji zahtijeva elastični medij za širenje, a razlika između

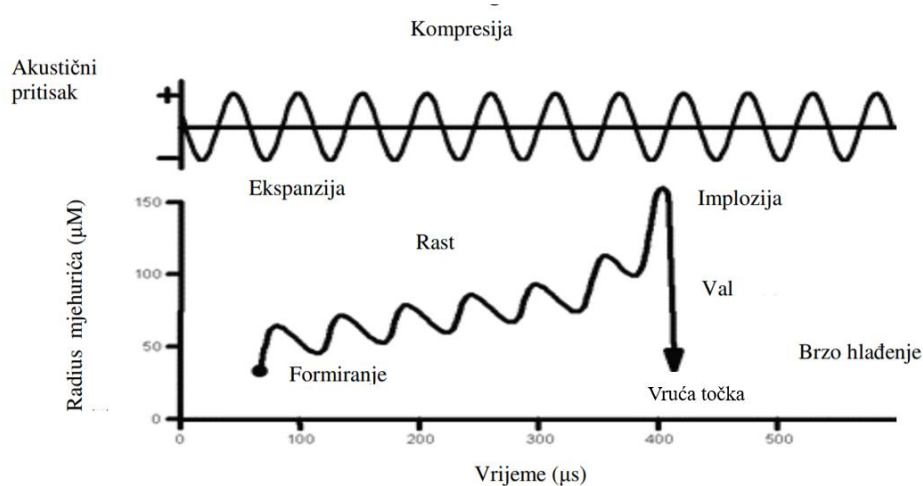
zvuka i ultrazvuka je frekvencija vala, odnosno zvučni valovi su na frekvencijama od 16 Hz do 20 kHz, dok ultrazvuk ima frekvencije veće od gornje granice osjetljivosti čovječjeg uha, ali ispod frekvencija mikrovalova (od 20 do 100 kHz) (Prado i Rostagno, 2022.).

Ultrazvuk je jedna od ključnih tehnologija u postizanju cilja održive "zelene" kemije i ekstrakcije. S rastućim troškovima energije i težnjom za smanjenjem emisija stakleničkih plinova, prehrambena industrija suočava se s izazovom pronalaska novih tehnologija kako bi smanjila potrošnju energije, ispunila zakonske zahtjeve vezane uz emisiju stakleničkih plinova, povećala sigurnost proizvoda i proizvodnog procesa te smanjila troškove proizvodnje, a pri tome povećala kvalitetu i funkcionalnost. Poznato je da ultrazvuk ima značajan utjecaj na brzinu raznih procesa u prehrambenoj industriji kao što filtracija, depolimerizacija, odzračivanje i deaeracija, ali i mnogi drugi. Primjenom ultrazvučne energije u filtraciji može povećati tok filtracije razbijanjem koncentracijske polarizacije i sloja kolača na površini membrane bez utjecaja na unutarnju membranu, a često se primjenjuje u proizvodnji voćnih ekstrakata i pića (Chemat i sur., 2017.). Ultrazvuk se koristi i odstranjivanju pjene u slučaju intenzivnog pjenjenja koje u većini tehnoloških procesa ima negativne posljedice. Također, jedna od najstarijih primjena ultrazvuka je depolimerizacija, odnosno razgradnja polimera koji se događa kao posljedica učinka kavitacije i uključuje dva moguća mehanizma: mehaničku degradaciju polimera iz srušenog kavitacijskog mjehurića i kemijsku degradaciju kao rezultat kemijske reakcije između polimera i molekula visoke energije kao što su hidroksilni radikali proizveden od fenomena kavitacije (Chemat i sur., 2017.).

Ultrazvuk se može primijeniti i u ekstrakciji. U usporedbi s konvencionalnim metodama ekstrakcije, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom razmatrana je zbog svojih mnogih prednosti. Korištenjem ultrazvuka, ekstrakcije mogu biti provedene u nekoliko minuta smanjujući potrošnju otapala, pojednostavljujući manipulaciju i obradu, dajući veću čistoću konačnog proizvoda, eliminirajući naknadnu obradu otpadne vode i trošeći samo djelić fosilne energije koja je inače potrebna za konvencionalne metode ekstrakcije (Chemat i sur., 2017.). Nadalje, siguran je i ekonomičan zbog činjenice da ova tehnologija omogućuje svoj razvoj u uvjetima atmosferskog tlaka i na temperaturi okoline (Medina-Torres, 2017.).

2.2.2. Mehanizam djelovanja UAE

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija zasniva se na pojavi koja se naziva akustična kavitacija (Syahir i sur., 2020.). Molekule od kojih se sastoji tekući medij drže se zajedno privlačnim silama i dok ultrazvučni val prolazi kroz tekući medij, izaziva uzdužno pomicanje tih molekula, djelujući kao klip na površini, što rezultira nizom faza kompresije i ekspanzije (Prado i Rostagno, 2022.). Molekule koje tvore tekuću fazu privremeno se pomaknu iz svog izvornog položaja i tijekom ciklusa kompresije mogu se sudarati s okolnim molekulama. Međutim, tijekom faza ekspanzije stvara se negativni tlak, razdvajajući molekule, a pri dovoljno visokom intenzitetu zvučnog vala privlačne sile između njih mogu biti prekoračene, stvarajući šupljinu u tekućini (Chemat i sur., 2017.). Praznine stvorene u mediju su kavitacijski mjehurići koji nastaju od otopljenih plinova (Prado i Rostagno, 2022.). Ovi kavitacijski mjehurići mogu rasti tijekom faza ekspanzije i smanjivati se u veličini tijekom ciklusa kompresije kao što je prikazano na slici 2.



Slika 2. Usporedba ciklusa kompresije i ekspanzije s formiranjem, rastom i implozijom kavitacijskog mjehurića (Dumić i Jambrak, 2010.)

Kada veličina tih mjehurića dosegne kritičnu veličinu, oni ne mogu više učinkovito apsorbirati energiju, a bez ulazne energije šupljina se ne može sama održavati te se mjehurić urušava u sebe (Drmić i Jambrak, 2010.). Oni kolabiraju tijekom ciklusa kompresije i oslobađaju velike količine energije. Kolaps kavitacijskih mjehurića stvara ekstremne lokalne uvjete: utvrđene su temperature do približno 5000 K i procijenjeni tlakovi oko 50-1000 atm (Chemat i sur., 2017.). Stvorene vruće točke mogu dramatično ubrzati kemijsku reaktivnost medija. Kada se mjehurići akustične kavitacije kolabiraju u blizini i na površini čvrstog

materijala, visoki tlak i temperatura koji se oslobađaju stvaraju mikromlaznice i udarne valove usmjerene prema tom materijalu (Prado i Rostagno, 2022.). Mehanički učinak akustične kavitacije nastao djelovanjem ultrazvuka povećava površinski kontakt između otapala i uzoraka (Azwanida, 2015.). Fizikalna i kemijska svojstva se mijenjaju, dolazi do razaranja stanične stijenke stanice i povećava se difuzija kroz membranu, odnosno stanica lizira i time olakšava oslobađanje sadržaja stanice (Syahir i sur., 2020.).

2.2.3. Parametri koji utječu na UAE

Neki od parametri koji utječu na ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom su frekvencija, valna duljina i amplituda te ulazna snaga, dizajn reaktora i oblik sonde. Proučavanje tih parametara od velike je važnosti kako bi se postigla visoka učinkovitost ekstrakcije koja često rezultira postizanjem najvećeg prinosa ekstrakcije. Intenzitet ultrazvuka izražava se kao energija prenesena po sekundi i po kvadratnom metru površine emitiranja, a ovaj je parametar u izravnoj korelaciji s amplitudom, odnosno porastom amplitude kolaps mjehurića će biti silovitiji (Chemat, 2017). Vrijeme ekstrakcije je također jedan od parametara koji utječe na učinkovitost ekstrakcije, a u direktnoj je korelaciji s temperaturom. Iako povećanjem temperature se povećava prinos, preduga izloženost materijala na visokim temperaturama može rezultirati propadanjem bioaktivnih spojeva od interesa (Prado i Rostagno, 2022.). Međutim, potrebno je uzeti u obzir da najveći prinos nije uvijek jedini cilj procesa ekstrakcije, nego može biti i najmanja upotreba i potrošnja energije.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. List šećerne repe

Tijekom ovog istraživanja korišteni su osušeni listovi šećerne repe koji su dobavljeni iz Turske od stane partnera FunTomP projekta. Pripremljeno je sveukupno 12 uzoraka osušenih listova šećerne repe: 9 uzoraka za provođenje ultrazvučne ekstrakcije i 3 uzorka za provođenje konvencionalne toplinske ekstrakcije. Svi uzorci pripremljeni su na način da je 2,00 g samljevenog osušenog lista šećerne repe promiješano sa 100 ml ekstrakcijskog otapala. Ekstrakcijsko otapalo koje je korišteno je 10% otopina pepela razrijeđena s vodom u omjeru 4:1, pH vrijednosti od 9,2.

3.1.2. Kemikalije

1. 10%-na otopina pepela razrijeđena s vodom u omjeru 4:1
2. Deionizirana voda (PBF, Zagreb, Hrvatska)
3. Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska) – razrijeđen destiliranom vodom u omjeru 1:2
4. reagens A: 2% Na_2CO_3 (Kemika, Zagreb, Hrvatska) u 0,1 M NaOH (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
5. reagens B: 0,5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, Neratovice, Češka) u 1% K,Na – tartaratu (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
6. reagens C: 50 ml reagensa A + 1 ml reagensa B
7. vodene otopine goveđeg serumskog albumina (eng. Bovine serum albumin, BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) koncentracija: 0.02 mg/mL; 0.04 mg/mL; 0.06 mg/mL; 0.08 mg/mL; 0.1 mg/mL
8. 20%-tna otopine natrijeva karbonata (Na_2CO_3)
9. standardna otopina galne kiseline 0,1 g/L (Acros Organics, New Jersey, SAD)
10. 0,3 M acetatni pufer, pH 3,6: 1,55 g natrijevog acetat trihidrata (GRAM MOL, Zagreb,

Hrvatska) otopi se u 8 mL ledene octene kiseline (J.T.Baker, Gliwice, Poljska) u odmjernoj tikvici od 500 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake

11. 10 mM otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazina, TPTZ (ACROSS ORGANICS, Geel, Belgija): 0,0312 g TPTZ otopi se u odmjernoj tikvici od 10 mL sa 40 mM HCl te se istom klorovodičnom kiselinom nadopuni do oznake
12. standard željezo (II) sulfat septahidrat ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) (Honeywell Fluka, Seelze, Njemačka): odvaži se 0,139 g i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 0,5 L, te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
13. 20 mM otopina željezovog (III) klorida, FeCl_3 (GRAM MOL, Zagreb, Hrvatska): 0,0541 g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ otopi u 10 mL destilirane vode
14. FRAP reagens: promiješano 50 mL acetatnog pufera, 5 mL TPTZ reagensa i 5 mL FeCl_3 (omjer 10:1:1)
15. 40 mM vodena otopina klorovodične kiseline, HCl (Carlo Erba Reagents S.A.S, Val de Reuil Cedex, Francuska)
16. 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) (abcr GmbH, Karlsruhe, Njemačka) u 96% metanolu
17. 1mM otopina standarda Trolox-a (Acros Organics, Geel, Belgija)

3.1.3. Uređaji

1. Ultrazvučni uređaj Q700 Sonicator (Qsonica, Newtown, SAD)
2. pH-EC metar HI5521-02 (Hanna Instruments Inc., Zagreb, Hrvatska)
3. Električna drobilica
4. Analitička vaga NBL-254i Nimbus (Adam Equipment Inc., Oxford, SAD)
5. Vorteks uređaj MX-S (Dlab, Peking, Kina)
6. UV-VIS spektrofotometar (Shimadzu Kyoto, Japan)
7. Ultrazvučna kupelj s grijanjem DT 100 H (Bandelin, Berlin, Njemačka)
8. Vakuum pumpa Rocker 300 (Rocker, Witeg, Wertheim, Njemačka)

9. Testna (klima) komora HPP110 (Memmert GmbH, Schwabach, Njemačka)

3.1.4. Laboratorijsko posuđe

1. Laboratorijska čaša
2. Laboratorijska špatula
3. Menzura
4. Odmjerna tikvica
5. Plastične ladice za vaganje
6. Plastične epruvete (Falcon)
7. Stakleni lijevci
8. Termometar
9. Kapaljka
10. Staklene kivete
11. Eppendorf epruveta (epice)
12. Staklene epruvete
13. Büchnerov lijevnik
14. Staklene pipete

3.2. METODE

3.2.1. Ultrazvučna ekstrakcija visokog intenziteta

Bioaktivni spojevi, odnosno polifenoli i proteini, ekstrahirani su iz lista šećerne repe primjenom ultrazvuka visokog intenziteta. Pri tome devet uzoraka tretirano je ultrazvukom visoke snage pri variranim parametrima ekstrakcije, a to su bili vrijeme koje je iznosilo 3, 6 ili 9 minuta te amplituda od 50, 75 ili 100 %. Svih devet različitih kombinacija amplitude i vremena trajanja ekstrakcije su prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Varijacije parametara (amplituda i vrijeme) ekstrakcije potpomognute ultrazvukom za različite uzorke

Oznaka uzorka	Amplituda (%)	Vrijeme tretmana (min)
LUA1	75	6
LUA2	75	3
LUA3	50	6
LUA4	50	9
LUA5	75	9
LUA6	100	9
LUA7	50	3
LUA8	100	6
LUA9	100	3

Postupak ekstrakcije:

U laboratorijsku čašu u kojoj se nalazi 2 g osušenog, usitnjenog uzorka lista šećerne repe pomoću menzure se prenese 100 ml ekstrakcijskog otapala (otopina pepela i vode). Laboratorijska čaša je zatim stavljena u plastičnu posudu napunjenu ledom i hladnom vodom te je tako stavljena u kućište ultrazvučnog aparata. U laboratorijsku čašu je uronjena ultrazvučna sonda i termočlanak za mjerenje temperature koja se mjerila prije početka te na kraju tretmana ultrazvukom. Ultrazvučna sonda je postavljena tako da bude uronjena u sredini volumena uzorka, a termočlanak je postavljen tako da ne dira sondu ni stijenku čaše. Nakon što se zatvorilo zvučno izolirano kućište ultrazvučnog aparata, na ekranu je unesena željena amplituda i vrijeme trajanja tretmana te je pokrenut tretman ultrazvukom visokog intenziteta. Po završetku ekstrakcije ultrazvukom provedena je vakuum filtracija. Dobivena suspenzija se profiltrira preko Büchnerovog lijevka uz pomoć vakuum pumpe te svaki dobiveni ekstrakt se prenosi u falkonicu od 15 ml koja je stavljena u hladnjak na +4°C te se na tim ekstraktima

kasnije provodila kemijska analiza. Izdvojenim filtratima pojedinog ekstrakta, izmjerene su pH vrijednosti i električna vodljivost (mS/cm) pri sobnoj temperaturi.

3.2.2. Toplinska ekstrakcija

Uz ultrazvučnu ekstrakciju, provedena je i toplinska ekstrakcija bioaktivnih spojeva lista šećerne repe pri 60°C. Toplinski tretman se provodio za tri uzorka pri čemu je korištena ultrazvučna kupelji, ali s obzirom da je kupelj služila isključivo za zagrijavanje uzoraka, mogućnost soniciranja bila je isključena. Tretirani uzorci označeni su prema vremenu trajanja toplinskog tretmana, koji je trajao 3, 6 i 9 minuta, kao LA/3, LA/6 i LA/9.

Postupak provedbe:

U laboratorijsku čašu u kojoj se nalazi 2 g osušenog i usitnjenog uzorka pomoću menzure se prenese 100 ml ekstrakcijskog otapala. Laboratorijska čaša s uzorkom i otapalom je zatim stavljena u vodenu kupelj. Praćen je porast temperature uzorka u laboratorijskoj čaši te kada je ona dosegla 60°C, započelo je mjerenje vremena tretmana uz miješanje. Nakon provedene toplinske ekstrakcije provedena je vakuum filtracija na isti način kao što je već opisano. Dobiveni ekstrakt prebačen je u falkonicu od 15 ml koja je stavljena u hladnjak na +4°C te se na tim ekstraktima kasnije provodila kemijska analiza. Izdvojenim filtratima pojedinog ekstrakta, također su izmjerene pH vrijednosti i električna vodljivost pri sobnoj temperaturi.

3.2.3. Određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom po Lowry-ju

Metoda po Lowry-ju je kolorimetrijska metoda koja služi za određivanje koncentracije ukupnih proteina u nekoj otopini. Mehanizam metoda se zasniva na reakciji Cu^{2+} iona s peptidnim vezama proteina u lužnatom mediju, pri čemu se isti reduciraju u Cu^+ te dolazi do formiranja Cu^+ -protein kompleksa. Mjerenje se provodi na način da se uzorku dodaju Cu^{2+} ioni koji su sastavni dio reagensa C te dolazi do formiranja Cu^+ -protein kompleksa. Zatim se u smjesu dodaje Folin-Ciocalteu reagens. Reakcijom ovog reagensa s Cu^+ -protein kompleksom razvija se plavo obojenje, a intenzitet obojenja mjeri se pomoću spektrofotometra. Izmjerena vrijednost apsorbancije pri valnoj duljini od 740 nm proporcionalna je intenzitetu obojenja, a ono je proporcionalno koncentraciji proteina u uzorku.

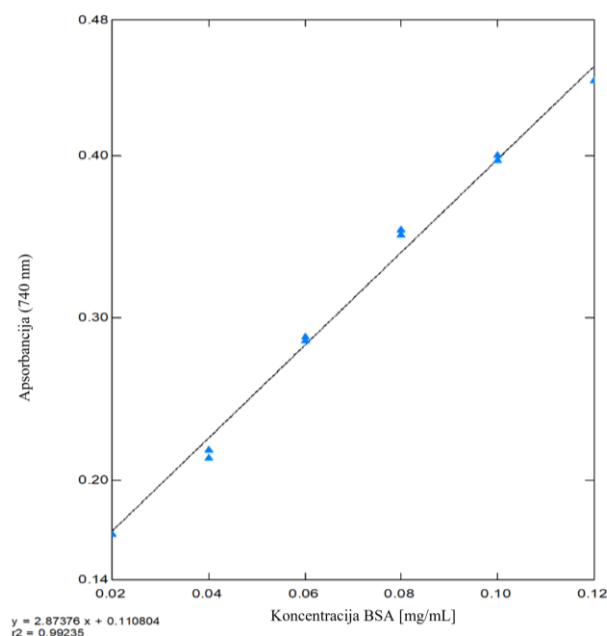
Prije određivanja koncentracije ukupnih proteina, dobiveni ekstrakti suhog lista šećerne repe razrijeđeni su 10 puta. Razrijeđenja su rađena kako bi apsorbancija bila u linearnom području 0-1, jer je jedino u tom rasponu koncentracija proteina proporcionalna apsorbanciji.

Postupak provođenja:

U laboratorijsku epruvetu se pomoću pipetmana stavlja 0,8 mL ekstrakta, 4 mL reagensa C te se sadržaj epruvete promiješa na vortex uređaju. Epruveta se zatim ostavi na sobnoj temperaturi 10 do 15 minuta kako bi se odvila reakcija. Nakon toga, naglo se dodaje 0,4 mL prethodno razrijeđenog Folin-Ciocalteau reagensa, uz jako miješanje na vortex uređaju, zbog njegove nestabilnosti u lužnatom mediju (reagens C). Potrebno je pripremiti i slijepu probu koja umjesto ekstrakta sadrži 0,8 mL ekstrakcijskog otapala. Svi pripremljeni uzorci i slijepa proba ostave se u mraku na sobnoj temperaturi 40 do 60 minuta, nakon čega dolazi do reakcije i pojave plavo-ljubičastog obojenja reakcijske smjese. Apsorbancija se mjeri na UV-VIS spektrofotometru pri valnoj duljini od 740 nm na način da se u kućište spektrofotometra stavlja kiveta sa slijepom probom i kiveta s uzorkom kojem se želi izmjeriti apsorbancija.

Izrada baždarnog dijagrama:

Kako bi se odredila nepoznata koncentracije ukupnih proteina u uzorku, nužno je prethodno izraditi baždarni dijagram koji pokazuje ovisnost izmjerene apsorbancije o poznatoj koncentraciji standarda govedeg serumskog albumina (eng. Bovine serum albumin, BSA). Za konstruiranje baždarnog dijagrama korištene su vodene otopine BSA koncentracija: 0,02 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,06 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,1 mg/mL te 0,12 mg/mL. Ponovi se prethodno opisani postupak reakcije te se na spektrofotometru se pri valnoj duljini od 740 nm izmjeri apsorbancija. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija (ordinata) i poznatih vrijednosti koncentracija BSA (apscisa) konstruira se baždarni dijagram (slika 3).



Slika 3. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA

Dobivena jednačba pravca baždarnog dijagrama glasi:

$$y = 2,87376 x + 0,110804 \quad R^2 = 0,99235 \quad /1/$$

gdje y predstavlja apsorbanciju pri 740 nm, x predstavlja koncentraciju proteina (mg/mL) te R^2 koeficijent determinacije. Iz ove jednačbe pravca baždarnog dijagrama moguće je izračunati nepoznatu koncentraciju ukupnih proteina u uzorcima lista šećerne repe.

3.2.4. Određivanje udjela ukupnih polifenolnih spojeva

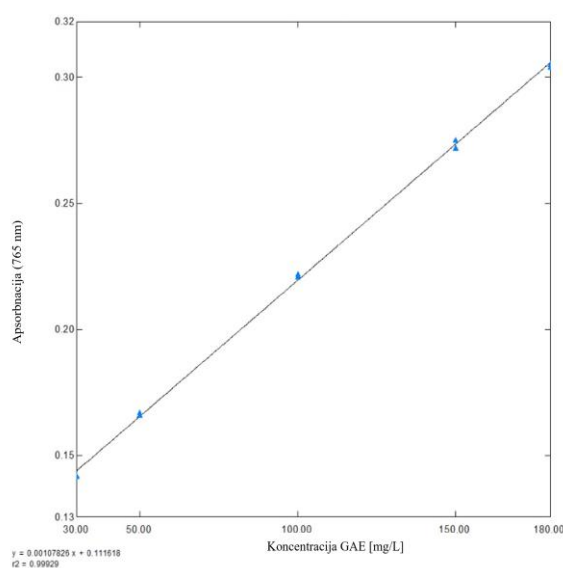
Metoda određivanja ukupnih polifenolnih spojeva se temelji na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim reagensom kao što su polifenolni spojevi. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline koje se pri oksidaciji polifenola reduciraju u plavo obojeni volframov i molibdenov oksid. Nakon dva sata reakcije u kojoj svi polifenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na 765 nm, a pri tome je nastalo obojenje proporcionalno udjelu polifenolnih spojeva u uzorku.

Postupak provođenja:

U epruvetu se otpipetira 7,9 mL destilirane vode, 0,1 mL uzorka te 0,5 mL prethodno razrijeđenog Folin-Ciocalteu reagensa. Sadržaj epruvete se promiješa te se doda 1,5 mL 20%-tne otopine natrijeva karbonata. Sadržaj tikvice se zatim ponovno dobro promiješa na vortexu. Uzorci pripremljeni na ovaj način se ostave stajati 2 sata u mraku na sobnoj temperaturi pri čemu dolazi do razvoja plavog obojenja, nakon čega se mjeri apsorbancija na 765 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se priprema na jednako kao i ispitivani uzorci, s razlikom da se umjesto uzorka dodaje jednaki volumen destilirane vode (0,1 mL).

Baždarni dijagram:

Kako bi se odredila nepoznata koncentracije ukupnih polifenola u uzorku, nužno je prethodno izraditi baždarni dijagram koji pokazuje ovisnost izmjerene apsorbancije o poznatoj koncentraciji standarda galne kiseline (GAE). Za konstruiranje baždarnog dijagrama korištene su vodene otopine GAE poznatih koncentracija: 30, 50, 100, 150 i 180 mg/L. Ponovi se prethodno opisani postupak reakcije s Folin-Ciocalteu reagensom. Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija galne kiseline, izradi se baždarni pravac (slika 4). Prema dobivenoj jednadžbi se izračunava koncentracija ukupnih polifenola u uzorcima za izmjerene vrijednosti apsorbancija, a rezultati se izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline.



Slika 4. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji GAE

Na temelju dobivenih rezultata, dobije se jednadžba pravca koja glasi:

$$y = 0,00107826 x + 0,111618 \quad R^2 = 0,99929 \quad /2/$$

gdje je y apsorbancija pri 765 nm, x ekvivalent GAE (mg/L) i R^2 koeficijent determinacije. Iz ove jednadžbe pravca moguće je izračunati nepoznatu koncentraciju ukupnih polifenola u uzorcima lista šećerne repe.

3.2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom se temelji na sposobnosti antioksidansa da reducira Fe^{3+} ione u žuto obojenoj otopini kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) u Fe^{2+} pri čemu nastaje plavo obojeni produkt. Reakcija se odvija u kiselom mediju kako bi se zadržala dobra topljivost željeza, a promjena boje se prati spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 595 nm. Rezultati su izraženi kao $\mu\text{mol } Fe^{2+}$ ekvivalenta (FE)/mL uzorka.

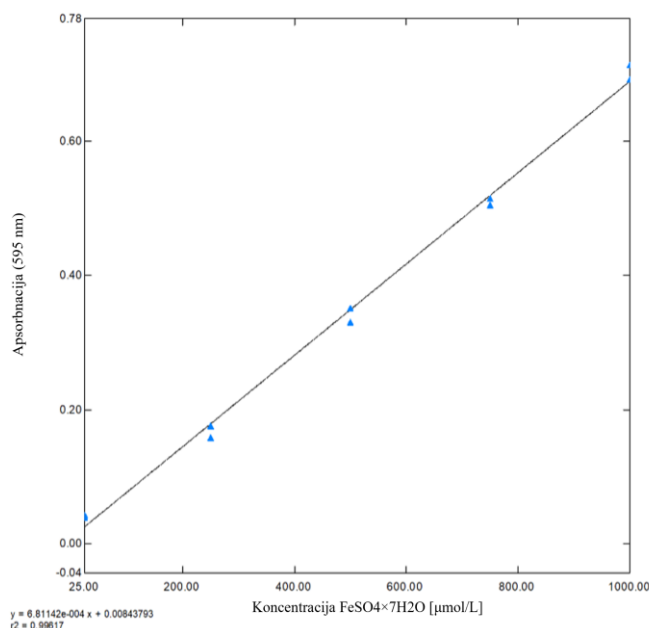
Postupak određivanja:

U epruvete se otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka te 2080 μL FRAP reagensa. Uzorak je prethodno razrijeđen 5 puta, tj. 0,5 ml uzorka se razrijedilo u 2 ml ekstrakcijskog otapala (otopina vode i pepela). Sadržaj u epruveti se promiješa na vortex uređaju te 5 minuta termostatira na temperaturi od 37°C (u ultrazvučnoj kupelji). Slijepa proba se priprema na isti način kao i ispitivani uzorci, s razlikom da se umjesto uzorka dodaje jednaki volumen otapala u kojem je uzorak ekstrahiran. Zatim se mjeri apsorbancija uzorka pri 595 nm na spektrofotometru, u odnosu na slijepu probu.

Baždarni dijagram:

Za određivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom, potrebno je prethodno izraditi baždarni dijagram koji pokazuje ovisnost izmjerene apsorbancije o poznatoj koncentraciji otopine željezo (II) sulfata septahidrata ($FeSO_4 \times 7H_2O$). Za pripremu baždarnog pravca pripreme se otopine $FeSO_4 \times 7H_2O$ poznatih koncentracija: 25, 200, 400, 600, 800 i 1000 $\mu\text{mol/L}$ te se ponovi prethodno opisani postupak reakcije s time da se umjesto uzorka u

reakcijsku smjesu dodaje 0,1 mL pripremljenih razrjeđenja otopine standarda. Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija, izradi se baždarni pravac (slika 5) prema čijoj jednadžbi se izračunava antioksidacijski kapacitet uzoraka.



Slika 5. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji FeSO₄·7H₂O

Na temelju dobivenih rezultata, dobije se jednadžba pravca:

$$y = 6,81142 \cdot 10^{-4} x + 0,00843793 \quad R^2 = 0,99617 \quad /3/$$

Gdje y predstavlja apsorbanciju pri 595 nm, x ekvivalent Fe²⁺ te R² koeficijent determinacije.

3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

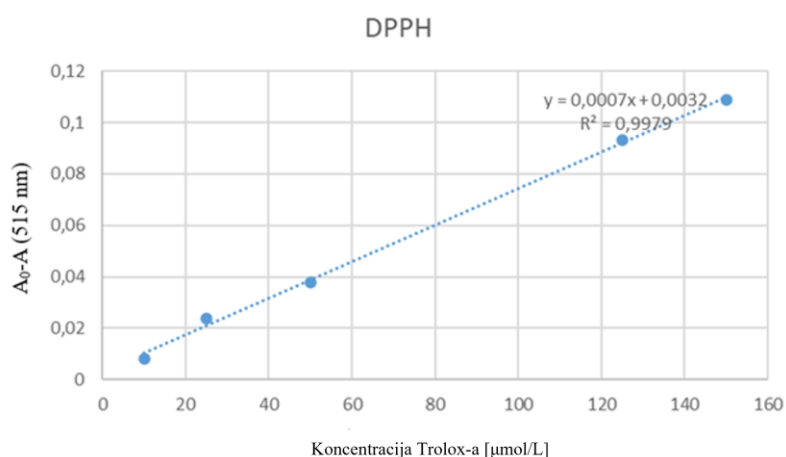
Određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom zasniva se na reakciji redukcije 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metalnoj otopini. U prisutnosti antioksidansa koji djeluje kao elektron donor, dolazi do stabilizacije DPPH radikala sparivanjem elektrona te dolazi do promjene boje iz ljubičaste (oksidirani oblik) u žutu (reducirani oblik). Promjena boje se prati spektrofotometrijski promjenom apsorbancije reakcijske smjese u definiranom vremenu u odnosu na isti učinak koji se postiže s poznatim reducensom, tj. Trolox-om.

Postupak određivanja:

Prvo se pripremi 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U epruvetu se otpipetira 100 μL uzorka, doda se 3,9 mL pripremljene otopine DPPH te se sadržaj epruvete promiješa na vortex uređaju. Epruvete se zatim ostave u mraku 30 minuta kako bi se odvila reakcija, nakon čega se mjeri apsorbancija pri 515 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se pripremi na isti način, ali umjesto uzorka dodaje se isti volumen metanola.

Baždarni dijagram:

Potrebno je prethodno izraditi baždarni dijagram koji pokazuje ovisnost izmjerene apsorbancije o poznatoj koncentraciji otopine Trolox-a. Otopine se pripreme na način da iz 1 mmol/L osnovne otopine standarda Trolox-a, redom otpipetira u odmjerne tikvice od 10 mL: 100 μL ; 250 μL ; 500 μL ; 1250 μL i 1500 μL te se nadopune do oznake 96% metanolom. Na taj način su pripremljena razrjeđenja: 10, 25, 50, 125 i 150 $\mu\text{mol/L}$ s kojima se ponovi prethodno opisan postupak reakcije. Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih vrijednosti koncentracija Trolox-a, izradi se baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji (slika 6).



Slika 6. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji Trolox-a

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0007 x + 0,0032 \quad R^2 = 0,9979 \quad /4/$$

gdje y predstavlja apsorbanciju pri 595 nm, x predstavlja ekvivalent Trolox-a ($\mu\text{mol/L}$) te R^2 koeficijent determinacije. Promjena apsorbancije DPPH radikala nakon reakcije s uzorkom računa se oduzimanjem apsorbancije uzorka (A) od apsorbancije slijepe probe (A_0). Koristeći baždarni pravac ista se preračuna na koncentraciju Trolox-a kojom se postiže isti reakcijski učinak. Rezultati su izraženi kao $\mu\text{mol/L}$ ekvivalenata Trolox-a.

3.2.7. Određivanje suhe tvari sušenjem do konstante mase

Udio suhe tvari osušenog lista šećerne repe se određivao gravimetrijski sušenjem do konstantne mase pri 105 °C. Određivanje se izvodilo na način da se na izvagane staklene posudice, koje su prethodno osušene u testnoj (klima) komori pri 105°C i ohlađena u eksikatoru (oko 20 min), izvaže približno 2,5 g uzorka i stavi u testnu komoru. Temperatura u testnoj komori je 105°C \pm 0,5 °C, a sušenje traje sat vremena. Nakon sat vremena sušenja, posudice s uzorkom je potrebno ohladiti u eksikatoru (oko 20 min), a zatim se tako ohlađene posudice s uzorkom važu. Postupci sušenja, hlađenja i vaganje posudica s uzorkom se ponavljaju sve dok razlika dva uzastopna sušenja u razmaku od pola sata ne bude manja od 0,001g.

Jednadžba prema kojoj se izračuna udio suhe tvar glasi:

$$\text{Suha tvar (\%)} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100 \quad /5/$$

gdje je m_0 masa prazne posudice, m_1 masa posudice s uzorkom prije sušenja i m_2 masa posudice s uzorkom nakon sušenja. Dobiven udio suhe tvari lista šećerne repe iznosi 94.49 \pm 1.6%.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Za određivanje koncentracije ukupnih proteina i fenola te određivanje antioksidacijske aktivnosti u dobivenim ekstraktima korištene su spektrofotometrijske metode pri čemu je apsorbancija izmjerena na valnim duljinama od 740 nm (za proteine), 765 nm (za polifenole), 765 nm (antioksidacijska aktivnost, FRAP metoda) i 515 nm (antioksidacijska aktivnost, DPPH metoda). Dobiveni rezultati analizirani su u programu MS Excel 365, zatim preračunati s obzirom na masu suhe tvari osušenog lista šećerne repe te su prikazani kao srednja vrijednost dva paralelna mjerenja sa odgovarajućim standardnim devijacijama. Dobivenim ekstraktima određene su pH vrijednost i električna vodljivost čiji su rezultati također prikazani kao srednja vrijednost dva paralelna mjerenja sa odgovarajućom standardnom devijacijom.

Statistička obrada podataka ultrazvučne ekstrakcije izrađena je u programu STATGRAPHICS pri čemu su ulazne varijable amplituda (50, 75 i 100 %) i vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 minuta). Rezultati statističke analize prikazani su za svaki izlazni parametar u obliku tablica analize varijanci, Pareto dijagrama, jednadžbe regresije, dijagrama odzivne površine i tablice optimalnih vrijednosti. Obrada rezultata toplinske ekstrakcije izvedena je pomoću programa Microsoft Excel 365 pomoću analize varijance s jednim promjenjivim faktorom, ANOVA-e.

4.1. REZULTATI PARAMETARA MJERENIH NAKON PROVEDENIH EKSTRAKCIJA

U tablici 2 prikazani su rezultati mjerenja pH vrijednosti, električne vodljivosti, prinos ukupnih proteina i fenola, antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom te DPPH metodom uzorka LUA nakon provedene ultrazvučno potpomognute ekstrakcije. Rezultati pokazuju kako se pH vrijednosti dobivenih ekstrakta uzorka LUA kreću se u rasponu od 6,96 do 7,27, a električna vodljivost u rasponu od 5,62 do 6,13 mS/cm. Prinos ukupnih proteina izražen s obzirom na suhu tvar listova šećerne repe obuhvaća vrijednosti u rasponu od $88,67 \pm 1,68$ do $120,12 \pm 1,94$ mg BSA/g_{s.tv.}, dok je prinos ukupnih polifenola oko 6 puta manji i nalazi se u rasponu od $14,78 \pm 1,18$ do $19,55 \pm 0,42$ mg GAE/g_{s.tv.}. Najveći prinos ukupnih proteina zabilježen je kod uzorka LUA4, a najveći prinos ukupnih polifenola kod uzorka LUA5. Oba

uzorka podliježu najdužem vremenu tretiranja (9 min), ali je razlika u primijenjenoj amplitudi, odnosno kod uzorka LUA4 iznosi 50%, a kod uzorka LUA5 75%. Najniže vrijednosti ukupnih proteina postižu se kod uzorka LUA2, a najniže vrijednosti ukupnih polifenola kod uzorka LUA7. Oba uzorka podliježu najkraćem vremenu tretiranja (3 min).

Tablica 2. Rezultati mjerenja ukupnih proteina (UP), ukupnih polifenola (UPF), pH vrijednosti, električne vodljivosti (G), antioksidacijske aktivnosti (AA) određena FRAP i DPPH metodom za ultrazvučno tretirane uzorke

UZORAK	Vrijeme [min]	Amplituda [%]	pH	G [mS/cm]	UPF [mg GAE/g _{s.tv.}]	UP [mg BSA/g _{s.tv.}]	AA FRAP [μmol Fe ²⁺ /g _{s.tv.}]	AA DPPH [μmol Trolox/g _{s.tv.}]
LUA1	6	75	7,18 ± 0,03	6,13 ± 0,02	17,95 ± 0,31	97,96 ± 1,80	119,55 ± 3,30	23,89 ± 1,28
LUA2	3	75	7,13 ± 0,02	5,62 ± 0,07	15,84 ± 0,24	88,67 ± 1,68	122,21 ± 1,22	21,12 ± 1,48
LUA3	6	50	7,12 ± 0,02	5,88 ± 0,02	17,58 ± 0,62	108,10 ± 1,31	141,17 ± 5,08	23,88 ± 0,26
LUA4	9	50	7,07 ± 0,03	5,80 ± 0,01	19,17 ± 1,42	120,12 ± 1,94	145,87 ± 3,97	21,11 ± 0,02
LUA5	9	75	7,27 ± 0,00	5,96 ± 0,05	19,55 ± 0,42	111,06 ± 1,27	149,35 ± 0,97	18,94 ± 0,89
LUA6	9	100	7,21 ± 0,00	5,97 ± 0,09	16,82 ± 0,80	97,41 ± 2,58	136,34 ± 4,17	22,10 ± 0,71
LUA7	3	50	6,96 ± 0,01	5,75 ± 0,04	14,78 ± 1,18	89,74 ± 1,94	116,52 ± 4,72	24,41 ± 0,69
LUA8	6	100	7,22 ± 0,00	5,99 ± 0,12	18,91 ± 0,00	110,13 ± 1,83	162,24 ± 5,91	19,54 ± 1,62
LUA9	3	100	7,05 ± 0,00	5,63 ± 0,00	14,86 ± 0,24	93,66 ± 3,25	166,99 ± 5,75	23,11 ± 1,60

Najveću vrijednost antioksidativne aktivnosti od uzoraka LUA određene FRAP metodom imao je uzorak LUA9 ($166,99 \pm 5,75 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$) pri najkraćem vremenu tretiranja i najvećoj amplitudi (100%), dok je najmanju vrijednost imao uzorak LUA7 ($116,52 \pm 4,72 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$) pri istom vremenu tretiranja, ali pri najnižoj amplitudi (50%). Vrijednosti antioksidativne aktivnosti dobivene FRAP metodom dosta se razlikuju od vrijednosti dobivenih DPPH metodom. DPPH metodom najveću antioksidativnu aktivnost ima uzorak LUA7 ($24,41 \pm 0,69 \mu\text{mol Trolox}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$) pri vremenu tretiranja od 3 minute, dok je najnižu imao LUA5 ($18,94 \pm 0,89 \mu\text{mol Trolox}/\text{g}_{\text{s.tv.}}$) kod vremena tretiranja od 9 minuta.

U tablici 3 prikazano je vrijeme tretiranja, rezultati mjerenja pH vrijednosti, električne vodljivosti, prinos ukupnih proteina i polifenola te antioksidativna aktivnost mjerena FRAP i DPPH metodom nakon provedene toplinske ekstrakcije. Izmjerene pH vrijednosti uzoraka dobivenih toplinskom ekstrakcijom nalaze se u rasponu od 7,00 do 7,02, a vrijednosti električne

vodljivosti u rasponu od 6,03 do 6,27 mS/cm. Najviše vrijednosti ukupnih proteina ($96,19 \pm 2,47$ mg BSA/g _{s.tv.}) i ukupnih polifenola ($19,15 \pm 0,49$ mg GAE/g _{s.tv.}) postižu se kod uzorka LA/6 kod kojeg je vrijeme tretiranja 6 minute. DPPH metodom izmjerene su najviše vrijednosti antioksidativne aktivnosti u uzorku LA/6, dok su najviše vrijednosti antioksidativne aktivnosti određene FRAP metodom izmjerene kod uzorka LA/3.

Tablica 3. Rezultati mjerenja ukupnih proteina (UP), ukupnih polifenola (UPF), pH vrijednosti, električne vodljivosti, antioksidacijske aktivnosti (AA) određene FRAP i DPPH metodom za toplinski obrađene uzorke

UZORAK	Vrijeme [min]	pH	G [mS/cm]	UPF [mg GAE/g _{s.tv.}]	UP [mg BSA/g _{s.tv.}]	AA FRAP [μ mol Fe ²⁺ /g _{s.tv.}]	AA DPPH [μ mol Trolox/g _{s.tv.}]
LA/3	3	7,02 \pm 0,01	6,07 \pm 0,06	15,54 \pm 0,73	92,46 \pm 0,49	148,39 \pm 7,81	26,19 \pm 1,61
LA/6	6	7,02 \pm 0,00	6,27 \pm 0,07	19,15 \pm 0,49	96,19 \pm 2,47	140,51 \pm 2,17	26,99 \pm 0,53
LA/9	9	7,00 \pm 0,01	6,03 \pm 0,04	17,39 \pm 0,42	91,38 \pm 1,05	138,91 \pm 10,09	23,01 \pm 1,30

Usporedbom rezultata, generalno je veći prinos ukupnih proteina i ukupnih polifenola uočen u uzorcima lista šećerne repe koji su tretirani ultrazvukom, u odnosu na toplinski obrađene uzorke. U svim uzorcima (i onima koji su tretirani UAE i koji su tretirani toplinom) uočen je oko 6 puta niži sadržaj ukupnih polifenola u odnosu na sadržaj ukupnih proteina. Niže vrijednosti ukupnih polifenola mogu se objasniti netopivosti svih vrsta polifenolnih spojeva u određenom otapalu, npr. lignin, flavonoid i ostali polifenoli netopljivi u vodi stvaraju u staničnoj stijenci hidrofobne veze s proteinima i polisaharidima te se ne mogu ekstrahirati (Medina-Torres, 2017.). Električna vodljivost uzoraka koji su podvrgnuti toplinskoj ekstrakciji, generalno je veća u odnosu na LUA uzorke tretirane ultrazvukom, ali je pH vrijednost u tim uzorcima niža. Također, pH vrijednost korištenog ekstrakcijskog otapala (otopina pepela i vode) je 9,2 te je u svim ekstraktima izmjerena znatno manja pH vrijednost. Promjena bioloških membrana posljedica je 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• i •OH radikala ($H_2O \rightarrow H\bullet + \bullet OH$), koji utječu na promjene pH vrijednosti (Vikulin i Vikulina, 2020). Prinos ukupnih polifenola je najveći pri najduljem vremenu tretiranja i najnižoj amplitudi, ali tada se ne postiže maksimalna antioksidacijska aktivnost, kao što se očekuje, nego tek prosječna vrijednost antioksidacijske aktivnosti koja je određena FRAP i

DPPH metodom. Nedostatak provedenih istraživanja čini rezultate mjerenja vrijednosti antioksidativne aktivnosti određene FRAP i DPPH metodom nakon ultrazvučno potpomognute ekstrakcije iz listova šećerne repe neusporedivima s ranije objavljenim podacima.

U drugim istraživanjima (Dukić i sur., 2022.), kod kojih je kao ekstrakcijsko otapalo korištena deionizirana vode sobne temperature i led, zabilježen je maksimalan prinos ukupnih proteina iz suhog lišća šećerne repe u iznosu od $107,20 \pm 9,23$ mg/g s.tv. te ukupnih polifenola u iznosu od $17,89 \pm 0,38$ mg/g s.tv. pri amplituda od 100% u trajanju od 9 minuta. Rezultati ovog rada se podudaraju s rezultatima prethodno navedenog istraživanja (Dukić i sur., 2022.) u tome što je maksimalan prinos ukupnih proteina i polifenola pri istom vremenu tretiranja (9 min), ali je u ovom radu ostvaren pri manjoj amplitudi. Povećanjem ultrazvučne snage, odnosno amplitude ultrazvuka koji putuje kroz otapalo, implozija kavitacijskih mjehurića će biti snažnija i uzorkovati veći prinos ekstrakcije, ali prevelika snaga 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). Osim razlike u amplitudi, u usporedbi prinosa ukupnih polifenola i ukupnih proteina s navedenim istraživanjem, on je znato veći, a to se može objasniti korištenim otapalom, odnosno u ovom je radu je kao ekstrakcijsko otapalo korištena otopina pepela i vode s pH vrijednosti 9,2, čiji lužnati uvjeti povoljno utječu i ostvaruju veći prinos ukupnih proteina i polifenola pri manjoj amplitudi.

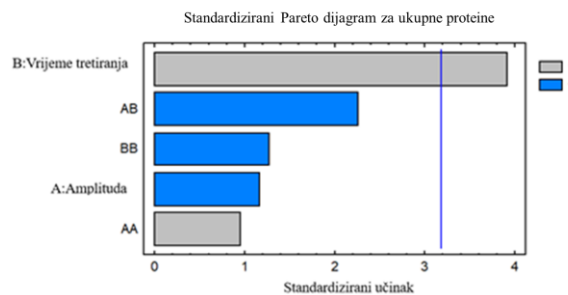
4.2. REZULTATI STATISTIČKE OBRADJE PODATAKA EKSTRAKCIJE POTPOMOŽNUTE ULTRAZVUKOM

Tablica 4. Prikaz p-vrijednosti za uzorke LUA koji su tretirani ultrazvukom (AA-kvadratna interakcija amplitude, AB-interakcija amplitude i vremena tretiranja, BB- kvadratna interakcija vremena tretiranja)

Ulazna varijabla	Izlazna varijabla					
	UP	UPF	AA DPPH	AA FRAP	pH	G
A:Amplituda	0,3304	0,7344	0,4739	0,1635	0,0455	0,5457
B:Vrijeme tretiranja	0,0298	0,0288	0,3379	0,4999	0,0268	0,0482
AA	0,4125	0,3783	0,5722	0,2338	0,0613	0,3712
AB	0,1095	0,3260	0,6557	0,1177	0,5754	0,2114
BB	0,2950	0,1723	0,7238	0,8918	0,1411	0,0482

*crveno označene vrijednosti označavaju statistički značajne vrijednosti ($p < 0,05$)

p-vrijednost pokazuje utjecaj ulazne varijable (amplituda i vrijeme tretiranja) i interakcije ulaznih varijabli na izlazne varijable (ukupne proteine, ukupne polifenole, antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP i DPPH metodom, pH i električnu vodljivost). U slučaju da ulazna varijabla ili interakcija varijabli, ima p-vrijednost manju od 0,05 to ukazuje da se značajno razlikuje od nule na pouzdanj razini od 95 % te se smatra statistički značajnim. Tablice varijanci, iz kojih su uzete p-vrijednosti za uzorke tretirane ultrazvukom prikazane su u prilogu 1. Iz tablice 4 vidljivo je da na izlazne vrijednosti ukupnih proteina uzoraka LUA samo jedan faktor ima statistički značajan utjecaj, a to je vrijeme tretiranja koje ima p-vrijednost 0,0298.



Slika 7. Pareto dijagram za ukupne proteine

Pareto dijagram (slika 7) vizualno prikazuje statističku značajnost zadanih vrijednosti. Plava linija dijeli statistički značajne vrijednosti od onih koje nisu statistički značajne, pri čemu sve što se nalazi desno od linije smatra se statistički značajnim, a sve što se nalazi lijevo od linije nije statistički značajno. U slučaju vrijednosti ukupnih proteina, jedini statistički značajni parametar je vrijeme tretiranja.

Tablica 5. Rezultati optimizacije i jednadžba regresije za ukupne proteine

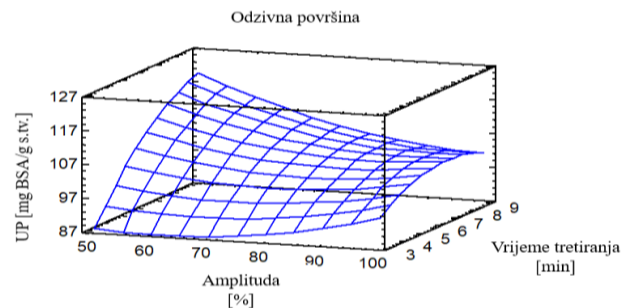
Faktor	Najmanja vrijednost	Najveća vrijednost	Optimalna vrijednost
Amplitude	50,0	100,0	50,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	9,0

Jednadžba regresije:

$$UP = 66,8939 - 0,530676 * \text{Amplituda} + 16,8439 * \text{Vrijeme tretiranja} + 0,00634318 * \text{Amplituda}^2 - 0,0887568 * \text{Amplituda} * \text{Vrijeme tretiranja} - 0,587307 * \text{Vrijeme tretiranja}^2$$

Moguće je predvidjeti okvirnu vrijednost ukupnih proteina te je moguće upravljati parametrima procesa ovisno o željenim rezultatima. Rezultati optimizacije (tablica 5) ukazuju na optimalnu amplitudu od 50% pri vremenu tretiranja od 9 minuta gdje dobivamo optimalnu vrijednost ukupnih proteina iznosa 120,301 mg BSA/g s.tv.. Jednadžba regresije za ukupne

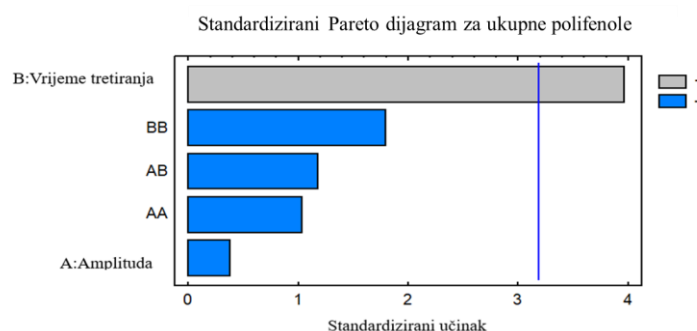
proteine (tablica 5) ilustrira kako se ponaša polinom izveden iz obrađenih rezultata, ovisno o vrijednostima amplitude i vremena tretiranja. Promjenom jedne varijable, mijenja se rezultat jednadžbe (prinos ukupnih proteina) pa se prilikom dizajniranja eksperimenta mogu predvidjeti izlazne vrijednosti. To nam olakšava prilagođavanje eksperimentalnih parametara ovisno o željenim prinosima ekstrakcije.



Slika 8. 3D dijagram odzivne površine za ukupne proteine

Dijagram odzivne površine za prinos ukupnih proteina (slika 8) prikazuje utjecaj zadanih parametara, odnosno amplitude i vremena tretiranja, na uspješnost ekstrakcije odnosno na prinos. Iz dijagrama je vidljivo da, iako nema statistički značajan utjecaj, porastom amplitude raste i prinos ukupnih proteina. Međutim, najviša točka na grafu, koja označava najveći prinos proteina, je pri amplitudi od 50 % i vremenu tretiranja od 9 minuta.

Rezultati analize varijanci za udio ukupnih polifenola uzorka LUA ukazuju da jedino vrijeme tretiranja ima statistički značajan učinak budući da ima p-vrijednost 0,0288. Navedeno se također može vidjeti na Paretovom grafu (slika 9) na kojem se samo vrijeme tretiranja nalazi desno od plave linije, iz čega se zaključuje kako vrijeme tretiranja najviše utječe na prinos polifenola prilikom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.



Slika 9. Pareto dijagram za ukupne polifenole

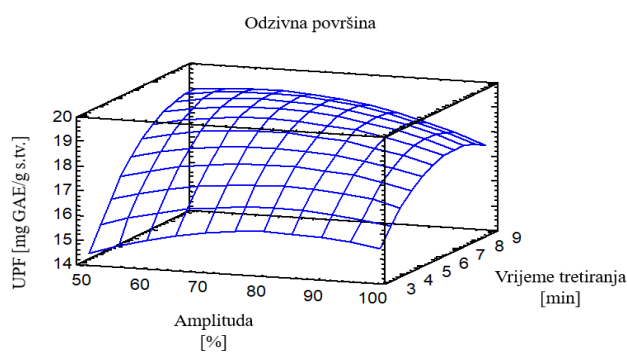
Za postizanje maksimalnih vrijednosti ukupnih polifenola iz listova šećerne repe tretmanom UAE, rezultati optimizacije (tablica 6) ukazuju da je optimalna amplituda od 65,032% i optimalno vrijeme trajanja tretmana 8,19827 minuta. Pri tome optimalna vrijednost ukupnih polifenola iznosi 19,2976 mg GAE/g_{s.tv.}. Kod eksperimentalnog dizajna UAE treba uzeti u obzir da je vrijeme trajanja statistički značajan parametar za izlaznu vrijednost ukupnih polifenola.

Tablica 6. Rezultati optimizacije i jednadžba regresije za ukupne polifenole

Faktor	Najniža vrijednost	Najviša vrijednost	Optimalna vrijednost
Amplituda	50,0	100,0	65,032
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	8,19827

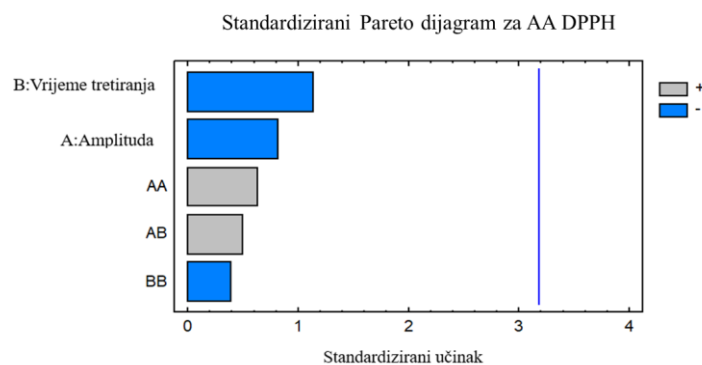
Jednadžba regresije;
 $UPF = 0,0727075 + 0,223944 * \text{Amplituda} + 2,91336 * \text{Vrijeme tretiranja} - 0,00121082 * \text{Amplituda}^2 - 0,00810546 * \text{Amplitude} * \text{Vrijeme tretiranja} - 0,145527 * \text{Vrijeme tretiranja}^2$

Iz dijagrama odzivne površine (slika 10) vidljivo je da amplituda i vrijeme tretiranja imaju određen utjecaj na uspješnost ekstrakcije. Uspješnost ekstrakcije, odnosno prinos ukupnih polifenola se povećava s dužim vremenom tretiranja pri nižoj amplitudi.



Slika 10. 3D dijagram odzivne površine za ukupne polifenole

Iz tablice p-vrijednosti (tablica 3) te iz Paretovog grafa (slika 11) vidljivo je da na vrijednost antioksidativne aktivnosti određene DPPH metodom uzorka LUA ne utječu ulazni parametri (amplituda i vrijeme tretiranja) niti njihove interakcije (interakcija amplitude i vremena tretiranja, kvadratna interakcija amplitude te kvadratna interakcija vremena tretiranja). Niti jedan od navedenih parametara nema statistički značajan utjecaj na vrijednost antioksidativne aktivnosti budući da su im p-vrijednosti veće od 0,05.



Slika 11. Pareto dijagram za antioksidativnu aktivnost određenu DPPH metodom

Za postizanje maksimalnih vrijednosti antioksidativne aktivnosti DPPH metodom suhih listova šećerne repe tretmanom UAE, rezultati optimizacije (tablica 7) ukazuju da je optimalna amplituda od 50% te da je optimalno vrijeme tretiranja 3 minuta. Optimalna vrijednost antioksidativne aktivnosti tada iznosi 24,5749 $\mu\text{mol Trolox/g s.tv.}$ Jednadžba regresije uzorka LUA opisuje kako se ponaša polinom dobiven iz obrađenih rezultata, zavisno o vrijednostima amplitude i vremena tretiranja, a prikazana je u tablici 7.

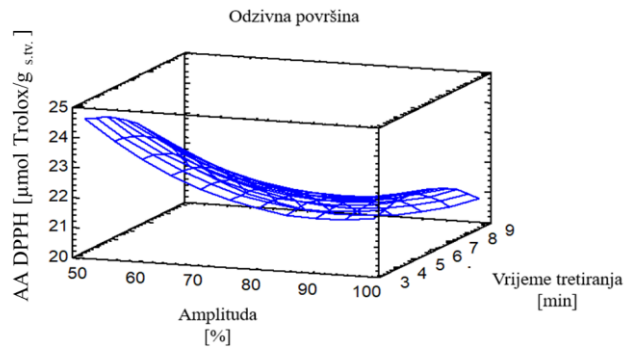
Tablica 7. Rezultati optimizacije i jednadžba regresije za antioksidativnu aktivnost određenu DPPH metodom

Faktor	Najniža vrijednost	Najviša vrijednost	Optimalna vrijednost
Amplitude	50,0	100,0	50,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	3,0

Jednadžba regresije:

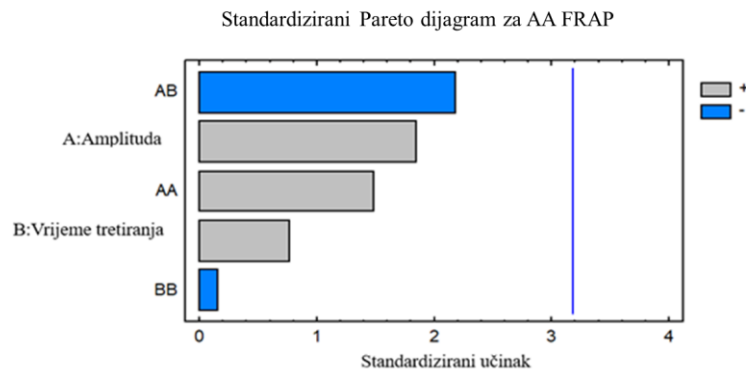
$$AA \text{ DPPH} = 36,4796 - 0,326517 * \text{Amplituda} - 0,0824754 * \text{Vrijeme tretiranja} + 0,00166387 * \text{Amplituda}^2 + 0,00765072 * \text{Amplituda} * \text{Vrijeme tretiranja} - 0,0709629 * \text{Vrijeme tretiranja}^2$$

Iz dijagrama odzivne površine (slika 12), koji prikazuje donos amplitude i vremena tretiranja na vrijednost antioksidativne aktivnosti određene DPPH metodom, vidljivo je da (iako niti amplituda ni vrijeme tretiranja nemaju statistički značajan učinak) smanjivanjem vremena tretiranja i istodobnim sniženjem amplitude, raste vrijednost antioksidacijske aktivnosti.



Slika 12. 3D dijagram odzivne površine za antioksidativnu aktivnost određenu DPPH metodom

Na antioksidativnu aktivnost određenu FRAP metodom uzorka LUA ne utječu ulazni parametri niti njihove interakcije (interakcija amplitude i vremena tretiranja, kvadratne interakcije). p-vrijednosti i Paretoovog dijagrama (slika 13) pokazuju kako amplituda i vrijeme tretiranja, kao i njihove interakcije, nemaju statistički značajan utjecaj budući da su im p-vrijednosti veće od 0,05.



Slika 13. Pareto dijagram za antioksidativnu aktivnost određenu FRAP metodom

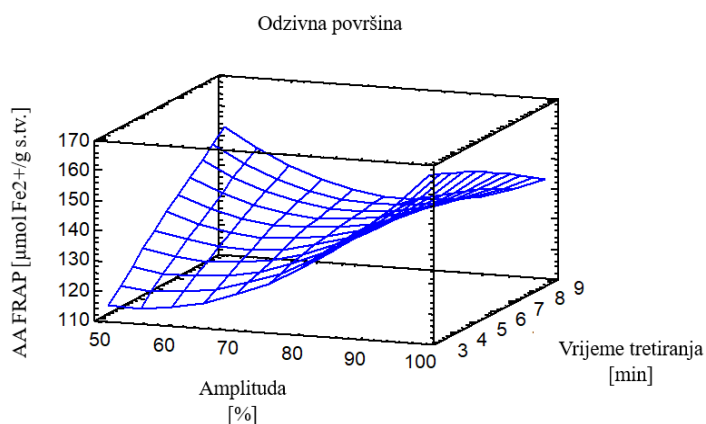
Rezultati optimizacije prikazani tablicom 8, pokazuju da za postizanje maksimalne izlazne vrijednosti antioksidativne aktivnosti određene FRAP metodom, optimalna vrijednost amplitude je 100% i vremena tretiranja 3 minute. Optimalna vrijednost maksimalne antioksidativne aktivnosti za uzorak LUA iznosi 165,407 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.tv.}$. Jednadžba regresije za vrijednost antioksidativne aktivnosti FRAP metodom uzorka LUA, također se nalazi se u tablici 8.

Tablica 8. Rezultati optimizacije i jednadžba regresije za antioksidativnu aktivnost određenu FRAP metodom

Faktor	Najniže vrijednosti	Najviše vrijednosti	Optimalne vrijednosti
Amplituda	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	3,0

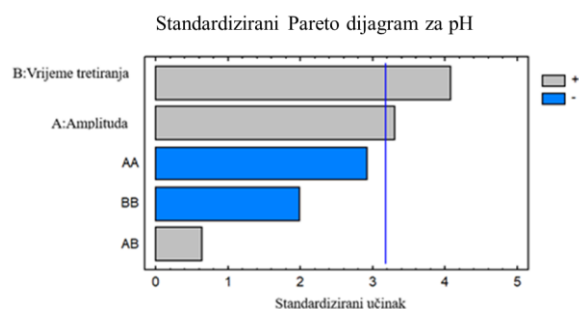
Jednadžba regresije:
 $AA\ FRAP = 126,32 - 1,86313 * Amplituda + 18,3567 * Vrijeme\ tretiranja + 0,0231774 * Amplituda^2 - 0,200014 * Amplituda * Vrijeme\ tretiranja - 0,16008 * Vrijeme\ tretiranja^2$

Dijagram odzivne površine za antioksidativnu aktivnost određenu FRAP metodom, koji je prikazan slikom 14, pokazuje promjene izlaznih vrijednosti s obzirom na amplitudu i vrijeme tretiranja. Vrijednosti antioksidativne aktivnosti rastu porastom amplitude te su najveće pri najvećoj amplitudi (100 %). S obzirom na vrijeme trajanja tretmana UAE, najviše vrijednosti se postižu kod najkraćeg tretmana (3 min). Pri tome, treba uzeti u obzir da niti jedan od ulaznih parametara nema statistički značajan utjecaj na vrijednost antioksidativne aktivnosti.



Slika 14. 3D dijagram odzivne površine za antioksidativnu vrijednost određenu FRAP metodom

Iz analiza varijance za pH vrijednost uzoraka LUA (prilog 1) vidi se kako vrijeme tretiranja i amplituda imaju p-vrijednost manju od 0,05, što ih čini statistički značajnim parametrima. Pareto dijagram za pH vrijednost (slika 15) također pokazuje statističku značajnost amplitude i vremena tretiranja.



Slika 15. Pareto dijagram za pH vrijednost uzoraka LUA

Rezultati optimizacije (tablica 9) pokazuju da je optimalna vrijednost amplitude 84,3649%, a optimalno vrijeme trajanja tretmana 7,89695 min kako bi se postigla optimalna vrijednosti pH koja iznosi 7,26131. Jednadžba regresije za pH vrijednosti uzorka opisuje kako se ponaša polinom zavisno o vrijednostima amplitude i vremena tretiranja, a prikazana je u tablici 9.

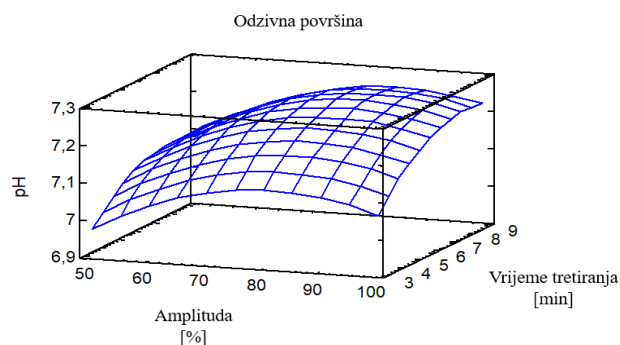
Tablica 9. Rezultati optimizacije i jednadžba regresije za pH vrijednost

<i>Faktor</i>	<i>Najmanje vrijednosti</i>	<i>Najviše vrijednosti</i>	<i>Optimalne vrijednosti</i>
Amplituda	50,0	100,0	84,3649
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	7,89695

Jednadžba regresije:

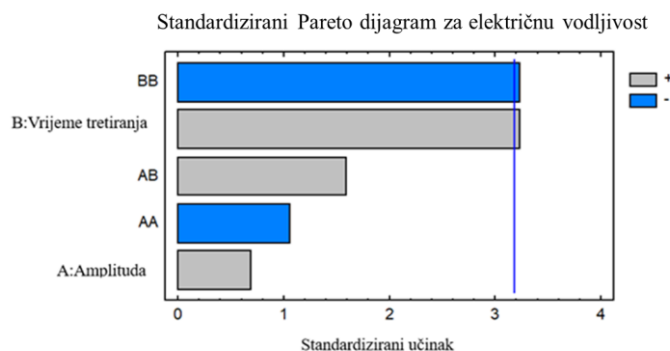
$$\text{pH} = 6,00758 + 0,02159 \cdot \text{Amplituda} + 0,086875 \cdot \text{Vrijeme tretiranja} - 0,000136 \cdot \text{Amplituda}^2 + 0,000171667 \cdot \text{Amplituda} \cdot \text{Vrijeme tretiranja} - 0,00641667 \cdot \text{Vrijeme tretiranja}^2$$

Na dijagramu odzivne površine za pH vrijednost (slika 16) vidljiv je rast pH vrijednosti s porastom amplitude te rast pH s obzirom na produljenje vremena tretiranja pri maksimalnoj amplitudi, odnosno više vrijednosti pH postižu se povećanjem ulaznih parametara.



Slika 16. 3D dijagram odzivne površine za pH vrijednost

Iz Pareto dijagrama za električnu vodljivost (slika 17) vidljivo je da na vrijednost električne vodljivosti statistički značajan utjecaj od ulaznih parametra imaju vrijeme tretiranja te kvadratna interakcija vremena tretiranja, dok ostali parametri nisu blizu statističke značajnosti. Analiza varijance za električnu vodljivost ukazuje da su p-vrijednosti vremena tretiranja ($p=0,0482$) i p-vrijednost kvadratne interakcije vremena tretiranja ($p=0,0482$) manje od 0,05 i s time se smatraju statistički značajnim parametrima.



Slika 17. Pareto dijagram za električnu vodljivost uzoraka

Rezultati optimizacije za električnu vodljivost (tablica 10) pokazuju da su za postizanje maksimalne vrijednosti električne vodljivosti, koja iznosi 6,06745 mS/cm, potrebni optimalni parametri, odnosno amplituda od 84,3813% i vrijeme tretiranja od 7,06141 minuta. Jednadžba regresije za električnu vodljivost opisuje kako se ponaša polinom dobiven iz obrađenih rezultata, zavisno o vrijednostima amplitude i vremena tretiranja, a prikazana je u tablici 10.

Tablica 10. Rezultati optimizacije i jednadžba regresije za električnu vodljivost

Faktor	Najmanja vrijednost	Najveća vrijednost	Optimalna vrijednost
Amplituda	50,0	100,0	84,3813
Vrijeme tretiranja	3,0	9,0	7,06141

Jednadžba regresije :

$$G = 4,72264 + 0,0114167 * \text{Amplituda} + 0,244458 * \text{Vrijeme tretiranja} - 0,000107733 * \text{Amplituda}^2 + 0,000958333 * \text{Amplituda} * \text{Vrijeme tretiranja} - 0,023037 * \text{Vrijeme tretiranja}^2$$

4.3. REZULTATI STATISTIČKE OBRADE PODATAKA TOPLINKSE EKSTRAKCIJE

Tablica 11. Prikaz p-vrijednosti za uzorke LA/ koji su tretirani toplinskim tretmanom

<i>Ulazna varijabla</i>	<i>Izlazna varijabla</i>					
	pH	G	UPF	UP	AA FRAP	AA DPPH
Vrijeme tretiranja	0,589284	0,947849	0,004908	0,000027	0,000023	0,000786

*crveno označene vrijednosti označavaju statistički značajne vrijednosti ($p < 0,05$)

ANOVA tablice uzorka LA/ koji su podvrgnuti toplinskoj ekstrakciji pokazuje statističku značajnost vremena tretiranja na izlazne vrijednosti varijabli na razini pouzdanosti od 95,0 % ($p < 0,05$), a nalaze se u prilogu 2. Usporedbom p-vrijednosti (tablica 11.) uočava se kako vrijeme tretiranja ima statistički značajan utjecaj na vrijednost ukupnih polifenolnih spojeva, ukupnih proteina, vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene FRAP te DPPH metodom. Vrijeme trajanja toplinskog tretmana nema statistički značajan utjecaj na pH ni na električnu vodljivost, budući da je izračunata p-vrijednost veća od 0,05.

5. ZAKLJUČCI

1. Najviši prinos ukupnih proteina, dobiven pomoću UAE, iznosio je $120,12 \pm 1,94$ mg BSA/g s.tv. pri primijenjenoj amplitude od 50% i vremenu tretiranja od 9 minuta. Statističkom obradom rezultata utvrdilo se da vrijeme ima statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$).
2. Statističkom analizom rezultata UAE utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) vremena tretiranja na izlazne vrijednosti ukupnih proteina, ukupnih polifenola, pH vrijednost te električnu vodljivost.
3. Statističkom analizom rezultata toplinske ekstrakcije utvrđen je statistički značajan utjecaj vremena tretiranja ($p < 0,05$) na izlazne vrijednosti ukupnih proteina, ukupnih polifenola, vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene FRAP i DPPH metodom.
4. Najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene FRAP i DPPH metodom uočene su ekstraktima dobivenim UAE pri najkraćem vremenu tretiranja (3 min).
5. U ekstraktima dobivenim toplinskom ekstrakcijom dobivene su najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene FRAP i DPPH metodom pri vremenu tretiranja od 3 minute.
6. Uzorci podvrgnuti toplinskoj ekstrakciji imaju veću električnu vodljivost od uzoraka tretiranih UAE, ali manju pH vrijednost.
7. Lišće šećerne repe predstavlja dobar izvor bioaktivnih spojeva čija bi proizvodnja održavala revalorizaciju agroindustrijskog otpada, a pri tome UAE uz primjenu otopine vode i pepela kao ekološki prihvatljivog otapala ima potencijalno koristan učinak na bolje iskorištenje.

6. POPIS LITERATURE

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>

Azwanida, N. N. (2015) A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*, 4(196), 2167-0412.

Bals, B. D., Dale, B. E., i Balan, V. (2012) Recovery of leaf protein for animal feed and high-value uses. *Biorefinery co-products: Phytochemicals, primary metabolites and value-added biomass processing*, 179-197.

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

Caliceti, C., Malaguti, M., Marracino, L., Barbalace, M. C., Rizzo, P., Hrelia, S. (2022) Agri-Food Waste from Apple, Pear, and Sugar Beet as a Source of Protective Bioactive Molecules for Endothelial Dysfunction and Its Major Complications. *Antioxidants*, 11(9), 1786. <https://doi.org/10.3390/antiox11091786>

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>

Dai, J., Mumper, R. J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.

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

Dukić, J., Hunić, M., Nutrizio, M., Režek Jambrak, A. (2022) Influence of High-Power Ultrasound on Yield of Proteins and Specialized Plant Metabolites from Sugar Beet Leaves (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *altissima*). *Applied Sciences*, 12(18), 8949.

Ebrahimi, P., Mihaylova, D., Marangon, C. M., Grigoletto, L., Lante, A. (2022) Impact of sample pretreatment and extraction methods on the bioactive compounds of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Molecules*, 27(22), 8110. <https://doi.org/10.3390/molecules27228110>

Edde, P. A. (2021) Field crop arthropod pests of economic importance, Academic Press, str. 276-347

Elliott, M. C., Weston, G. D. (1993) Biology and physiology of the sugar-beet plant, Dordrecht: Springer Netherlands., str. 37-66 https://doi.org/10.1007/978-94-009-0373-9_2

Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., Cárcel, J. A. (2011) Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews*, 3, 108-120.

Lorizola, I. M., Furlan, C. P., Portovedo, M., Milanski, M., Botelho, P. B., Bezerra, R. M., Capitani, C. D. (2018) Beet stalks and leaves (*Beta vulgaris* L.) protect against high-fat diet-induced oxidative damage in the liver in mice. *Nutrients*, 10(7), 872. <https://doi.org/10.3390/nu10070872>

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

Medina-Torres N, Ayora-Talavera T, Espinosa-Andrews H, Sanchez-Contreras A, Pacheco N (2017). Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy* 7. <https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>

Prado, J., Rostagno, M. (2022) *Natural product extraction: principles and applications*. Royal Society of Chemistry.

Syahir, A., Sulaiman, S., Mel, M., Othman, M., Sulaiman, S. Z. (2020) An Overview: Analysis of ultrasonic-assisted extraction's parameters and its process. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 778, No. 1, p. 012165). IOP Publishing.

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>

van Krimpen MM, Bikker P, van der Meer IM, van der Peet-Schwering CMC (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.

7. PRILOZI

Prilog 1. Tablice analize varijanci redom za ukupne proteine, ukupne polifenole, za antioksidativnu aktivnost određenu FRAP metodom te DPPH metodom, pH vrijednost te električnu vodljivost uzorka LUA (AA-utjecaj amplitude i amplitude, AB-utjecaj amplitude i vremena tretiranja, BB-utjecaj vremena tretiranja i vremena tretiranja)

Analiza varijanci za udio ukupnih proteina uzoraka LUA

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	P-vrijednost
A:Amplituda	46,8212	1	46,8212	1,34	0,3304
B:Vrijeme tretiranja	532,226	1	532,226	15,26	0,0298
AA	31,4343	1	31,4343	0,90	0,4125
AB	177,25	1	177,25	5,08	0,1095
BB	55,8787	1	55,8787	1,60	0,2950
Ukupna pogreška	104,628	3	34,8759		
Ukupno (korelacija)	948,238	8			

*podebljane vrijednosti označavaju statistički značajne vrijednosti ($p < 0,05$)

Analiza varijanci za udio ukupnih polifenola uzoraka LUA

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	P-vrijednost
A:Amplituda	0,149352	1	0,149352	0,14	0,7344
B:Vrijeme tretiranja	16,8822	1	16,8822	15,67	0,0288
AA	1,14537	1	1,14537	1,06	0,3783
AB	1,47822	1	1,47822	1,37	0,3260
BB	3,43083	1	3,43083	3,19	0,1723
Ukupna pogreška	3,23148	3	1,07716		
Ukupno (korelacija)	26,3175	8			

*podebljane vrijednosti označavaju statistički značajne vrijednosti ($p < 0,05$)

Analiza varijanci za antioksidativnu aktivnost određenu DPPH metodom uzoraka LUA

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	P-vrijednost
A:Amplituda	3,61112	1	3,61112	0,67	0,4739
B: Vrijeme tretiranja	7,0072	1	7,0072	1,29	0,3379
AA	2,16287	1	2,16287	0,40	0,5722
AB	1,317	1	1,317	0,24	0,6557
BB	0,815789	1	0,815789	0,15	0,7238
Ukupna pogreška	16,2399	3	5,41329		
Ukupno (korelacija)	31,1539	8			

*podebljane vrijednosti označavaju statistički značajne vrijednosti ($p < 0,05$)

Analiza varijanci za antioksidativnu aktivnost određenu FRAP metodom uzoraka LUA

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	P-vrijednost
A:Amplituda	640,892	1	640,892	3,37	0,1635
B:Vrijeme tretiranja	111,16	1	111,16	0,59	0,4999
AA	419,683	1	419,683	2,21	0,2338
AB	900,124	1	900,124	4,74	0,1177
BB	4,15134	1	4,15134	0,02	0,8918
Ukupna pogreška	569,779	3	189,926		
Ukupno (korelacija)	2645,79	8			

*podebljane vrijednosti označavaju statistički značajne vrijednosti ($p < 0,05$)

Analiza varijanci za pH vrijednost uzoraka LUA

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	P-vrijednost
A:Amplitude	0,0184815	1	0,0184815	10,94	0,0455
B:Vrijeme tretiranja	0,0279484	1	0,0279484	16,55	0,0268
AA	0,01445	1	0,01445	8,55	0,0613
AB	0,000663062	1	0,000663062	0,39	0,5754
BB	0,00667012	1	0,00667012	3,95	0,1411
Total error	0,00506744	3	0,00168915		
Total (corr.)	0,0732805	8			

*podebljane vrijednosti označavaju statistički značajne vrijednosti ($p < 0,05$)

Analiza varijanci za električnu vodljivost uzoraka LUA

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	P-vrijednost
A:Amplituda	0,00380017	1	0,00380017	0,46	0,5457
B:Vrijeme tretiranja	0,0859207	1	0,0859207	10,43	0,0482
AA	0,00906756	1	0,00906756	1,10	0,3712
AB	0,0206641	1	0,0206641	2,51	0,2114
BB	0,0859742	1	0,0859742	10,44	0,0482
Ukupna pogreška	0,024714	3	0,00823802		
Ukupno (korelacija)	0,230141	8			

*podebljane vrijednosti označavaju statistički značajne vrijednosti ($p < 0,05$)

Prilog 2. ANOVA tablice redom za pH, električnu vodljivost, ukupne polifenole, ukupne proteine, za antioksidativnu aktivnost određenu FRAP metodom te DPPH metodom uzorka LA (AA-utjecaj amplitude i amplitude, AB-utjecaj amplitude i vremena tretiranja, BB-utjecaj vremena tretiranja i vremena tretiranja)

Analiza varijance za pH vrijednost

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupnjevi slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>f-omjer</i>	<i>p-vrijednost</i>	<i>F (kritično)</i>
Između skupina	1,545845	1	1,545845	0,343517	0,589284	7,708647
Unutar skupina	18,00022	4	4,500056			
Ukupno	19,54607	5				

Analiza varijanci za električnu vodljivost

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupnjevi slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>f-omjer</i>	<i>p-vrijednost</i>	<i>F (kritično)</i>
Između skupina	0,021841	1	0,021841	0,004845	0,947849	7,708647
Unutar skupina	18,03229	4	4,508071			
Ukupno	18,05413	5				

Analiza varijanci za ukupne polifenole

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupnjevi slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>f-omjer</i>	<i>p-vrijednost</i>	<i>F (kritično)</i>
Između skupina	193,6498	1	193,649783 6	31,6540885 1	0,004908	7,708647
Unutar skupina	24,47075	4	6,11768629 9			
Ukupno	218,1205	5				

Analiza varijanci za ukupne proteine

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupnjevi slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>f-omjer</i>	<i>p-vrijednost</i>	<i>F (kritično)</i>
Između skupina	11443,94	1	11443,9396	1487,805	2,7E-06	7,708647
Unutar skupina	30,76731	4	7,69182644 3			
Ukupno	11474,71	5				

Analiza varijanci za antioksidativnu aktivnost određenu FRAP metodom

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupnjevi slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>f-omjer</i>	<i>p-vrijednost</i>	<i>F (kritično)</i>
Između skupina	27990,19	1	27990,1911 8	1611,576	2,3E-06	7,708647
Unutar skupina	69,47283	4	17,3682078 5			
Ukupno	28059,66	5				

Analiza varijanci za antioksidativnu aktivnost određenu DPPH metodom

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupnjevi slobode</i>	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>f-omjer</i>	<i>p-vrijednost</i>	<i>F (kritično)</i>
Između skupina	564,3422	1	564,342163 8	84,02998	0,000786	7,708647
Unutar skupina	26,86385	4	6,71596252 8			
Ukupno	591,206	5				

Izjava o izvornosti

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

Vlastoručni potpis