

Ultrazvučna ekstrakcija proteina i fenolnih spojeva iz suhog lista šećerne repe

Orašćanin, Adna

Master's thesis / Diplomski 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:159:267537>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 27. rujan 2023.

Adna Oraščanin

**ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA
PROTEINA I FENOLNIH
SPOJEVA IZ SUHOG LISTA
ŠEĆERNE REPE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za održivi razvoj u Zavodu za opće programe Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta 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/>), pod vodstvom dr. Mecit Halil Oztopa. 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 nove ekološki prihvatljive tehnologije prerade koje će minimalno utjecati na hranjive tvari, s dodatnim zdravstvenim prednostima uz primjenu održivog ciklusa proizvoda i procesa te valoriziranjem poljoprivrednog otpada.



This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 PRIMA programme under grant agreement No: 2032

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

ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA PROTEINA I FENOLNIH SPOJEVA IZ SUHOG LISTA ŠEĆERNE REPE

Adna Oraščanin, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058212626

Sažetak: List šećerne repe čini glavni dio otpada u proizvodnji šećera, a budući da je bogat izvor proteina, fenolnih spojeva i antioksidansa, ima velik potencijal za iskorištenje u prehrambenoj industriji i kao alternativni izvor proteina. Cilj rada je utvrditi utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta i konvencionalne toplinske ekstrakcije na prinos ukupnih fenolnih spojeva i proteina te na antioksidacijsku aktivnost spojeva u suhom listu šećerne repe. Spektrofotometrijski je utvrđeno da su prinosi fenolnih spojeva podjednaki u oba slučaja ekstrakcije, prinosi proteina i antioksidacijska aktivnost (DPPH metoda) viši su u slučaju ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta, dok je antioksidacijska aktivnost spojeva (FRAP metoda) viša u slučaju toplinske ekstrakcije proteina i fenolnih spojeva. Statističkom obradom u programu STATGRAPHICS utvrđen je statistički značajan utjecaj amplitude ultrazvuka na koncentraciju ekstrahiranih ukupnih proteina i antioksidacijsku aktivnost spojeva (FRAP). Utjecaj vremena tretiranja suhog lišća pri toplinskoj ekstrakciji ima statistički značajan utjecaj na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva, proteina i antioksidacijsku aktivnost spojeva (FRAP i DPPH).

Ključne riječi: *ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, konvencionalna toplinska ekstrakcija, proteini, fenolni spojevi, list šećerne repe*

Rad sadrži: 50 stranica, 8 slika, 8 tablica, 50 literaturnih navoda, 36 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Sveučilišta u Zagrebu 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. prof.dr.sc. Anita Slavica (predsjednik)
2. prof.dr.sc. Anet Režek Jambrak (mentor)
3. prof.dr.sc. Mojca Čakić Semenčić (član)
4. prof.dr.sc. Igor Stuparević (zamjenik)

Datum obrane: 27. rujan 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of general Programs
Laboratory for Sustainable development

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

ULTRASONIC EXTRACTION OF PROTEINS AND PHENOLIC COMPOUNDS FROM DRY LEAF OF SUGAR BEET

Adna Oraščanin, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058212626

Abstract: Sugar beet leaf is the main part of the waste in sugar production and since it is a rich source of protein, phenolic compounds and antioxidants, it has great potential for use in the food industry and as an alternative source of protein. The aim of the work is to determine the influence of high-intensity ultrasound and conventional thermal extraction on the yield of total phenolic compounds and proteins and on antioxidant activity of compounds. It was determined spectrophotometrically that the yields of phenolic compounds are equal in both cases of extraction, protein yields and antioxidant activity compounds (DPPH method) are higher in the case of extraction assisted by high-intensity ultrasound, while antioxidant activity compounds (FRAP method) is higher in the case of thermal extraction of proteins and phenolic compounds. Statistical processing in the STATGRAPHICS program revealed a statistically significant influence of amplitude ultrasound on concentration of total proteins and antioxidant activity of compounds (FRAP). The influence of treatment time of dry leaves during thermal extraction has a statistically significant effect on concentration total phenolic compounds, proteins, antioxidant activity (FRAP and DPPH).

Keywords: *ultrasonic assisted extraction, conventional heat extraction, proteins, phenolic compounds, sugar beet leaf*

Thesis contains: 50 pages, 8 figures, 8 tables, 50 references, 36 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the University of Zagreb 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. Anita, Slavica, PhD, Full professor (president)
2. Anet, Režek Jambrak, PhD, Full professor (mentor)
3. Mojca, Čakić Semenčić, PhD, Full professor (member)
4. Igor, Stuparević, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 27th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ODRŽIVI RAZVOJ	2
2.2. ŠEĆERNA REPA	3
2.2.1. List šećerne repe	4
2.3. FUNKCIONALNI SASTOJCI U SASTAVU ŠEĆERNE REPE	4
2.3.1. Fenolni spojevi	4
2.3.2. Antioksidansi	6
2.3.3. Proteini	6
2.4. EKSTRAKCIJA	8
2.5. ULTRAZVUK	9
2.5.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. MATERIJALI	12
3.1.1. Suhi list šećerne repe	12
3.1.2. Kemikalije i standardi	14
3.1.3. Uređaji i pribor	16
3.2. METODE	17
3.2.1. Konvencionalna toplinska ekstrakcija fenolnih spojeva i proteina	17
3.2.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta	18
3.2.3. Određivanje koncentracije ukupnih fenolnih spojeva	20
3.2.4. Određivanje koncentracije ukupnih proteina po Lowryu	22
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	25
3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom	27
3.2.7. Određivanje ukupne suhe tvari sušenjem lista šećerne repe do konstantne mase	29
3.2.8. Statistička obrada podataka	30
4. REZULTATI I RASPRAVA	32
4.1. REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETARA DOBIVENIH NAKON TOPLINSKE I EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE ULTRAZVUKOM VISOKOG INTENZITETA	32
4.1.1. Vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara nakon toplinske ekstrakcije	32
4.1.2. Vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta	33
4.1.3. Ukupna suha tvar u uzorku određena sušenjem lista šećerne repe do konstantne	

mase	35
4.1.4. Usporedba rezultata dobivenih nakon toplinske ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta	35
4.2. REZULTATI STATISTIČKE OBRADÉ PODATAKA	37
4.2.1. Rezultati statističke obrade podataka za uzorke podvrgnute toplinskoj ekstrakciji	37
4.2.2. Rezultati statističke obrade podataka fizikalno-kemijskih parametara uzoraka podvrgnutih ekstrakciji ultrazvukom visokog intenziteta	38
5. ZAKLJUČCI	43
6. LITERATURA	45
7. PRILOZI	51

1. UVOD

List šećerne repe smatra se poljoprivrednim otpadom i u proizvodnji šećera uglavnom se baca, a u nekim slučajevima se koristi u proizvodnji stočne hrane, alkohola, kvasca i sl. Zbog svog nutritivnog sastava (vlakna, proteini, vitamini, minerali), ali i potencijalnih funkcionalnih svojstava (emulgiranje, pjenjenje, vezanje vode, geliranje), list šećerne repe predmet je brojnih istraživanja kako bi se koristio u prehrambenoj industriji i kao alternativni izvor proteina. Međutim, složena strukturna obilježja, interakcija s drugim molekulama, prisutnost alergena i anti-nutrijenata te slaba osviještenost populacije o alternativnim izvorima proteina doprinose slabijoj iskorištenosti potencijala na ovom području. Još jedan od razloga zbog kojeg se potrebno okrenuti alternativnim izvorima proteina je i taj što proizvodnja proteina animalnog podrijetla ima brojne negativne posljedice, a neke od njih su emisija stakleničkih plinova, onečišćenje voda, devastacija okoliša.

Poznato je da prehrambena industrija proizvodi ogromnu količinu otpada što predstavlja veliki ekonomski, društveni i ekološki problem. Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (eng. *Food and Agriculture Organization*, FAO) procjenjuje da jedna trećina hrane (1,3 milijardi tona) proizvedene na svijetu godišnje završava kao otpad (FAO, 2011). Iz tog razloga javlja se sve veći interes za koncept održivog razvoja i kružnog gospodarstva u sklopu kojeg se otpad prehrambene industrije prerađuje u komercijalno vrijedne i iskoristive proizvode korištenjem „zelenih“ metoda.

Proteini iz lista šećerne repe mogu se ekstrahirati na razne načine, bilo konvencionalne, bilo inovativne, no zbog nedostataka konvencionalnih metoda sve se više okreće primjeni alternativnih „zelenih“ i održivih metoda. Jedna od tih metoda je i ultrazvuk visokog intenziteta. To je netoplinska tehnika koja koristi zvučne valove iznad gornje granice osjetljivosti ljudskog uha i omogućuje ekstrakciju spojeva uz manja narušavanja strukture, u odnosu na konvencionalne metode.

Cilj ovog rada bio je steći nova znanja o listu šećerne repe i potencijalnim mogućnostima njegovog korištenja u prehrambenoj industriji te uočiti utjecaj vremena tretiranja i primijenjene amplitude ultrazvuka visokog intenziteta na prinos proteina i fenolnih spojeva te na antioksidacijsku aktivnost lista šećerne repe.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ODRŽIVI RAZVOJ

U proteklih 30 godina došlo je do velikog napretka i razvoja. Očekivani životni vijek u zemljama u razvoju porastao je za više od 20 godina, stope smrtnosti dojenčadi su prepolovljene, a proizvodnja i potrošnja hrane porasla je za oko 20 % brže u odnosu na porast stanovništva. Postignut je napredak u prehrani, zdravstvenom i obrazovnom području, ali i u komunikaciji i tehnologiji. Međutim, spomenuti napredak je nažalost popraćen negativnim trendovima kao što su ekonomske razlike i siromaštvo, utjecaj bolesti na razvoj stanovništva (HIV, malarija i sl.) te prekomjerna potrošnja resursa u industrijaliziranim zemljama, što pridonosi klimatskim promjenama i degradaciji okoliša, gubitku šuma, prirodnih staništa i bioraznolikosti (Bass i Dalal-Clayton, 2002). Stoga su se države na Samitu o planetu Zemlji Ujedinjenih Naroda (*United Nations, UN*), održanom 1992. godine u Rio de Janeiru, složile da razvoj treba biti održiv. To u izravnoj definiciji znači da su nacije u stanju postići pozitivan gospodarski i društveni razvoj, bez pretjerane degradacije okoliša, na način koji istovremeno štiti prava i mogućnosti nadolazećih generacija (Bass i Dalal-Clayton, 2002). Održivi razvoj ima tri ključna cilja: ekonomsku učinkovitost, socijalnu pravednost i održivost okoliša. Ostvarivanje tih ciljeva zahtijeva značajne promjene u načinu razmišljanja i korištenju resursa. Kroz promjenu načina razmišljanja, svaki pojedinac treba poticati jednakost i poštivanje prava pojedinca, recikliranje otpada i korištenje obnovljivih izvora energije, a sve to sa svrhom smanjenja otpada i sprječavanja nestašice vode u sadašnjosti, ali i budućnosti (Dukić i sur., 2022). Održiva poljoprivredna proizvodnja, uključujući njezine ekonomske, ekološke i društvene aspekte prepoznata je kao jedan od glavnih ciljeva Zajedničke poljoprivredne politike EU-e. To je u skladu s Agendom održivog razvoja do 2030. koju su u rujnu 2015. usvojile sve države članice UN-a, a koja uključuje 17 ciljeva održivog razvoja koje je potrebno ostvariti do 2030. godine. EU je odigrala aktivnu ulogu u oblikovanju Agende 2030 i brzo se posvetila provedbi svojih ciljeva u vanjskoj i unutarnjoj politici (Matthews, 2020).

U sklopu održivog razvoja sve se više pažnje pridaje 'zelenim' tehnologijama poput ultrazvuka visokog intenziteta, a posebno u području ekstrakcije raznih bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala u svrhu povećanja prinosa uz istovremeno smanjenje troškova i utjecaja na okoliš (Gadioli Tarone i sur., 2021).

2.2. ŠEĆERNA REPA

Šećerna repa (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *Altissima*) (Slika 1) dvogodišnja je biljka koja raste u umjerenim klimatskim zonama i na neutralnom tlu. Uz šećernu trsku, čini jedan od dva glavna globalna izvora saharoze (Rajaeifar i sur., 2019). Godišnje se na svjetskoj razini proizvede čak 30 % šećera iz šećerne repe, no osim šećera, ona je i dobra sirovina za proizvodnju bioetanola te stočne hrane (Dohm i sur., 2014). Šećerna repa koju danas poznajemo nastala je sredinom osamnaestog stoljeća selekcijom iz stočne repe uzgojene u Šleziji, u Njemačkoj, no upotreba ove vrste tek se s vremenom povećavala. 1747. godine njemački kemičar Andreas Marggraf otkrio je da kristali nastali nakon sirove ekstrakcije praškastih korijena šećerne repe nalikuju kristalima saharoze. To je dovelo do pokušaja izdvajanja šećera iz repe i na kraju osnivanja industrije šećerne repe, koja je danas ujedno i glavna kultura u Europi za proizvodnju šećera (Subrahmanyeswari i Gantait, 2022). Šećerna repa za uzgoj zahtijeva puno svjetla i temperature između 15 i 25 °C. Visoke temperature mogu usporiti njen rast, a niske temperature mogu negativno utjecati na klijanje sjemena i rast korijena, dok nedostatak svjetla uzrokuje niži prirod korijena i šećera. Također, šećernu je repu potrebno opskrbljivati vodom, posebno u vrijeme intenzivnog rasta (kraj srpnja, početak kolovoza) i ekstremnih suša. Optimalno vrijeme za sjetvu šećerne repe je rano proljeće, dok se berba vrši u tehnološkoj zriobi, što je otprilike nakon 5-9 mjeseci rasta. Repa se može brati ručno (vilama), plugom, ali u današnjoj industriji najčešće se koriste automatizirani strojevi poput kombajna ili linija za branje (sjekač glava, vadicica, utovarivač). Strojeve treba dobro podesiti tako da pravilno režu glave, a pritom ne oštećuju korijen. Korijen je nakon berbe potrebno što prije preraditi kako bi se smanjili nepotrebni gubitci (Agroklub, 1998).



Slika 1. Šećerna repa (Anonymous 1, 2023)

2.2.1. List šećerne repe

Budući da se šećerna repa uzgaja primarno zbog korijena, koji se i koristi u industriji, lišće koje zaostaje, iako se koristi kao hrana za stoku, uglavnom se smatra poljoprivrednim otpadom (Hrvatska enciklopedija, 2021). List, ovisno o sorti, čini 20-34 % biljke (Tamayo Tenorio, 2017). Međutim, za razliku od lišća ostalih biljaka, list šećerne repe pokazao se kao vrlo dobar izvor proteina (čak 19,4–22,8 % suhe tvari) pa se sve više istraživanja usmjerava na istraživanje mogućnosti iskorištenja lista šećerne repe (Maravić i sur., 2022). Nadalje, listovi imaju i ujednačen sastav aminokiselina, a prisutnost esencijalnih aminokiselina poput leucina, valina, fenilalanina, lizina, treonina, izoleucina i metionina podiže njihovu nutritivnu vrijednost (Akyüz i Ersus, 2021). Potrebe za spomenutim aminokiselinama uglavnom se zadovolje iz hrane životinjskog podrijetla, poput mesa, ribe, mlijeka i jaja, no zbog povećanja svjetske populacije, ali i sve popularnije veganske prehrane postoji potreba za alternativnim biljnim izvorima proteina. Zbog svog aminokiselinskog sastava, lišće šećerne repe bi, stoga, moglo biti dobar izvor za proizvodnju koncentrata proteina biljnog podrijetla (Akyüz i Ersus, 2021). Osim proteina, lišće sadrži i minerale (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, Zn, Si), vitamine (A, B, C, D, E, K, U), fitokemijske tvari (karoten, klorofil, kumarini, izoflavoni) i sekundarne metabolite (fitoestrogeni poput izoflavona i kumestrola) (Tamayo Tenorio, 2017).

2.3. FUNKCIONALNI SASTOJCI U SASTAVU ŠEĆERNE REPE

2.3.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi najzastupljeniji su sekundarni biljni metaboliti. Oni imaju zajedničku kemijsku strukturu koja se sastoji od aromatskog prstena na koji je vezan jedan ili više hidroksilnih supstituenata. Fenoli se mogu podijeliti u nekoliko glavnih skupina, a to su flavonoidi, fenolne kiseline, tanini, stilbeni i lignani (Xu i sur., 2017). Raznolikost struktura utječe na njihova svojstva, a samim time i na specifičnu ulogu u biljkama. Tako fenolni spojevi imaju širok raspon uloga od privlačenja kukaca u svrhu oprašivanja i širenja sjemena (antocijani), zaštite biljnih tkiva od sunčevog ultraljubičastog zračenja (eng. *ultraviolet*, *UV*) (flavanoli), do odbijanja biljojeda, gljivica, virusa (proantocijani, hidrolizabilni tanini). Tijekom obrade i skladištenja hrane, fenolni spojevi pregrađuju se u različite produkte koji zajedno s izvornim biljnim komponentama pridonose kvaliteti hrane biljnog podrijetla.

(Cheynier, 2012). Osim dobrobiti za samu biljku, fenolni spojevi pokazali su se korisnima i za zdravlje čovjeka. Fenoli imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje putem svojih antibakterijskih, antifungalnih, protuupalnih, antitumorskih svojstava, ali i antioksidacijskih svojstava. Smatraju se prirodnim antioksidansima koji poboljšavaju kvalitetu hrane usporavanjem oksidacije lipida (Ebrahimi i sur., 2022). Različite studije dokazale su preventivnu ulogu fenolnih spojeva u kardiovaskularnim i neurodegenerativnim stanjima, kao i kod drugih bolesti i karcinoma (*in vivo* i *in vitro* istraživanja) (Alara i sur., 2021).

Na topljivost fenola, kao i na druga fizikalna i kemijska svojstva utječe njihova struktura. Primjerice, fenoli visoke molekulske mase često su netopljivi u vodi upravo zbog svoje nepolarne strukture (Alara i sur., 2021). Neki fenolni spojevi su stabilni, dok su drugi podložni oksidacijama, termolabilni su ili hlapljivi, stoga je odabir postupka ekstrakcije vrlo bitan kako bi se što manje oštetili ciljani spojevi. Trenutno ne postoji općeprihvaćeni niti univerzalni postupak za ekstrakciju svih fenolnih spojeva ili onih određene skupine te se za potrebe ekstrakcije vrši optimizacija parametara i postupka, pri čemu se u obzir uzimaju vrsta spoja kojeg želimo ekstrahirati, vrsta biljnog materijala iz kojeg ih želimo ekstrahirati te dostupnost same tehnike (Alara i sur., 2021). Ekstrakcija fenolnih spojeva iz biljnih izvora obično se provodi konvencionalnim metodama, primjerice maceracijom. Međutim, ove tehnike zahtijevaju puno vremena te velike količine otapala i energije. Zbog toga postoji sve veća potražnja za novim metodama ekstrakcije (npr. ekstrakcija ultrazvukom visokog intenziteta, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija visokim tlakom, ekstrakcija potpomognuta enzimima i sl.) bez spomenutih nedostataka (Ebrahimi i sur., 2022).

El-Gengaihi i sur. (2016) u svom radu navode da lišće šećerne repe sadrži veliku količinu galne (344 µg/ml) i ferulične (89,7 mg/mL) kiseline te male količine kafeinske kiseline, cimetne kiseline i katehina. Također, uočeno je da vodeni i etanolni ekstrakti šećerne repe imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala, smanjujući tako razine radikala. Ekstrakti šećerne repe pokazali su izvanrednu antihepatotoksičnu aktivnost kod oštećenja jetre izazvanih ugljikovim tetrakloridom, dovodeći do poboljšanja svih jetrenih enzima i antioksidativnih enzima.

2.3.2. Antioksidansi

Prema Halliwellu (1996) antioksidansi su tvari koje, kada su prisutne u niskim koncentracijama u usporedbi s koncentracijama supstrata koji se može oksidirati, značajno odgađaju ili sprječavaju oksidaciju tog supstrata. Supstrati koji se mogu oksidirati su gotovo sve makromolekule koje nalazimo u živim stanicama, odnosno proteini, lipidi, ugljikohidrati, vitamini, DNA. Mehanizmi kojima djeluju antioksidansi mogu uključivati uklanjanje kisika, uklanjanje reaktivnih vrsta dušika/kisika i njihovih prekursora, inhibicija nastanka reaktivnih vrsta dušika/kisika, vezanje metalnih iona potrebnih za inhibiciju nastanka reaktivnih vrsta, poboljšanje endogene antioksidativne obrane i sl. Budući da hrana, ali i ljudsko tijelo obiluju molekulama koje su podložne djelovanju aktivnih radikala, odnosno reaktivnih vrsta dušika i kisika, antioksidansi imaju povoljno djelovanje na ljudsko zdravlje jer već spomenutim mehanizmima sprječavaju ili usporavaju oksidaciju supstrata i na taj način štite stanice od oštećenja. Osim toga, antioksidansi su od interesa za prehrambenu industriju jer navedenim mehanizmima sprječavaju i užeglost hrane (Halliwell i sur., 1995).

Antioksidansi su heterogena skupina koju je teško klasificirati prema zajedničkim strukturnim svojstvima. Štoviše, treba uzeti u obzir i druge spojeve koji ne djeluju izravno kao antioksidansi, već neizravno, bilo modulacijom izravnih agenasa ili regulacijom biosinteze antioksidativnih proteina, potičući njihovu sintezu. S obzirom na veliki broj i različite molekule koje izravno i neizravno imaju antioksidativne učinke, u antioksidanse se ubrajaju vitamini, aminokiseline, proteini, minerali, enzimi (Vertuani i sur., 2004).

Kao što je već spomenuto, glavninu antioksidacijske aktivnosti u listu šećerne repe pripisuje se fenolnim spojevima, što potvrđuju Maravić i sur. (2022) koji navode kako je uočena snažna korelacija između udjela fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti. Odnosno kako je u uzorcima s manjim udjelom fenolnih spojeva uočena i manja antioksidacijska aktivnost.

2.3.3. Proteini

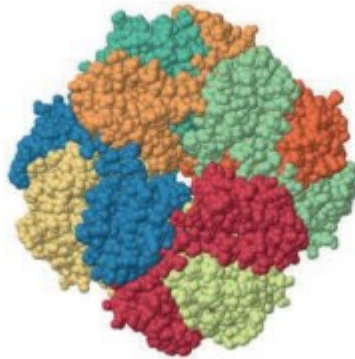
Proteini su makromolekule koje se nalaze u svim živim organizmima i od velike su važnosti za sve funkcije žive stanice. Proteini imaju više funkcija u organizmu, a one uključuju katalizu reakcija (enzimi), pohranu i prijenos manjih molekula i iona, obranu organizma

(protutijela) te mnoge druge vitalne funkcije (Hrvatska enciklopedija, 2021). Proteini su građeni od gradivnih podjedinica, aminokiselina, međusobno povezanih peptidnom vezom u lance. Biološka funkcija proteina proizlazi iz njihove specifične prostorne građe, odnosno native konformacije, a nepovoljni uvjeti (previsoka ili preniska temperatura, jake lužine i kiseline i sl.) dovode do gubitka te native konformacije, tj. dovode do denaturacije proteina (Hrvatska enciklopedija, 2021). S obzirom na osjetljivost proteina, važno je obratiti pozornost na metodu kojom će se vršiti njihova ekstrakcija kako ne bi došlo do narušavanja strukture proteina. Kada se radi o ekstrakciji proteina iz biljnih materijala, biljne stanice imaju dodatnu barijeru, odnosno staničnu stijenku. Stanična stijenka sastoji se od vrlo složene strukture koja uključuje celulozu, hemicelulozu, pektin i glikoproteine pa ta složena struktura može potencijalno predstavljati problem kod ekstrakcije i utjecati na prinose proteina (Akyüz i Ersus, 2020). Primjenom različitih metoda ekstrakcije, proteini se mogu pročistiti iz biljnog materijala i pripremiti za daljnju upotrebu.

U današnje vrijeme interes za proteinima biljnog podrijetla znatno je porastao, a proizvodnja i potrošnja proteina biljnog podrijetla smatra se održivijom budući je poznato kako proizvodnja proteina životinjskog podrijetla uzrokuje 75 % ukupnih emisija plinova u poljoprivredi (Goktakyoglu i sur., 2023). Svijet se trenutno suočava s neviđenom potražnjom za biljnim izvorima proteina. Osim pozitivnog utjecaja na okoliš, ljudi se sve više okreću biljnim izvorima proteina zbog alergija na hranu životinjskog podrijetla, potencijalnih pozitivnih učinaka na zdravlje, ali i zbog etičkih pitanja u proizvodnji proteina životinjskog podrijetla (Gracio i sur., 2023).

Kao što je već spomenuto list šećerne repe bogat je izvor proteinima. Sadržaj proteina u listovima šećerne repe procjenjuje se na 400-600 kg/ha, što se može usporediti s proizvodnjom proteina iz soje (450-600 kg/ha) i žitarica (\approx 570 kg/ha) (Tamayo Tenorio, 2017). Količina i kvaliteta proteina ekstrahiranih iz lišća ovise o kemijskom sastavu lišća, a sastav o raznim čimbenicima kao što su starost šećerne repe i vrijeme žetve (Kiskini i sur., 2016). Protein koji prevladava u lišću (otprilike 50 % ukupnih topivih proteina) je ribuloza 1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza (RuBisCO) (Slika 2), koji je odgovoran za fiksaciju CO₂ tijekom fotosinteze (Goktakyoglu i sur., 2023). RuBisCO je jedan od najzastupljenijih proteina u biljkama i sastoji se od osam velikih podjedinica (53 kDa) i osam malih podjedinica (14 kDa) koje se okupljaju u 550 kDa kompleks (Tamayo Tenorio, 2017). Ovaj protein, koji je jedan od ključnih u odvijanju procesa fotosinteze, pokazuje veliki potencijal i za korištenje u ljudskoj

prehrani. Naime, RuBisCO ima uravnotežen sastav esencijalnih aminokiselina, izvor je treonina, valina, izoleucina, triptofana, leucina i bioaktivnih peptida, lako je probavljiv i ne pokazuje alergnost (smatra se nealergijskim proteinom). Osim toga, pokazuje brojna organoleptička, funkcionalna i fizikalna svojstva koja su vrlo obećavajuća za prehrambenu industriju (Gracio i sur., 2023). Ima veoma dobra svojstva pjenjenja, želiranja, geliranja i emulgiranja. Emulgirajuća sposobnost RuBisCO-a veća je čak od proteina bjelanjaka. Međutim, zbog njegove osjetljivosti i složene ekstrakcije, ekstrakcija RuBisCO-a još uvijek nije dovoljno iskorištena (Di Stefano i sur., 2018).



Slika 2. Prostorni model kristalne strukture RuBisCO-a izoliranog iz špinata koji se sastoji od 8 velikih i 8 malih podjedinica. Sve podjedinice prikazane su različitim bojama (*prema* Kiskini, 2017)

2.4. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija predstavlja postupak odvajanja odabranih tvari iz neke smjese s pomoću prikladnog otapala ili otopine. To je laboratorijski i industrijski postupak i osnovna tehnološka operacija koja se temelji na raspodjeli otopljene tvari između dviju tekućina (otopine i otapala) koje se međusobno ne miješaju (teža i lakša faza). Osim tekuće-tekuće ekstrakcije, ekstrakcija se može provoditi i čvrsto-tekuće, uz pomoć topline, ali i novijim postupcima kao što su ekstrakcija superkričnim fluidom, ekstrakcija visokim tlakom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija hladnom plazmom, enzimski potpomognuta ekstrakcija, ekstrakcija uz pomoć pulsirajućeg električnog polja i sl.

(Picot-Allain i sur. 2021). Konvencionalne metode ekstrakcije (poput ekstrakcije toplinom, maceracije, ekstrakcije tekuće-tekuće i kruto-tekuće) zahtijevaju prethodno mehaničko razbijanje stanica (drobljenje, mljevenje, toplinski, kemijski i sl.) kako bi se iz njih oslobodile željene komponente, a to može dovesti do oštećenja i djelomičnog gubitka tih komponenti. Također, takve tehnike zahtijevaju velike količine otapala, koja su često štetna, ekstrakcija je dugotrajna, a kvaliteta i prinosi tako dobivenih ekstrakata su manja (Rasul, 2018). Sve veća javna svijest o zaštiti okoliša i održivom razvoju, potaknule su intenzivna istraživanja o primjeni novih metoda ekstrakcije. Nove metode ekstrakcije razvijene su kako bi se ublažili ili u potpunosti uklonili nedostaci konvencionalnih metoda ekstrakcije. Nove, 'zelene' metode ekstrakcije zahtijevaju manje vremena, energije i otapala te su stoga u skladu sa strategijama održivog razvoja. Štoviše, uporaba 'zelenih' otapala (poput destilirane vode, NaOH, etanola i sl.) omogućuje ekstrakciju i dobivanje spojeva bez štetnih kemikalija (Picot-Allain i sur., 2021). Ekstrakcija jednom od tih metoda, odnosno ultrazvukom visokog intenziteta, primijenjena je i u ovom radu.

2.5. ULTRAZVUK

Ultrazvuk je zvuk koji je iznad praga ljudskog sluha (iznad 18 kHz) te se obično dijeli na tri područja. Ultrazvuk u području od 16 do 100 kHz predstavlja ultrazvuk niskog intenziteta, u području od 100 kHz do 1 MHz ultrazvuk visokog intenziteta, dok je u području od 1 do 10 MHz dijagnostički ultrazvuk. Ultrazvuk se generira s piezoelektričnim ili magnetostrikcijskim pretvaračima koji stvaraju visokoenergetske vibracije. Ove vibracije se pojačavaju i prenose na sonotrodu ili sondu, koja je u izravnom kontaktu s uzorkom (Režek Jambrak i sur., 2010). Slično svim zvučnim valovima, ultrazvuk se pojavljuje u nizu valova kompresije i razrjeđivanja koji se raspršuju kroz molekule medija kojem je izložen. Pri visokom intenzitetu, ciklusi razrjeđivanja savladavaju privlačne sile molekula medija, stvarajući kavitacijske mjehuriće (Picot-Allain i sur., 2021). Odnosno, ultrazvučni valovi prolaze kroz bilo koji fizički medij, sabijajući i rastežući molekularni razmak medija kroz koji prolaze. Tijekom ciklusa negativnog tlaka, tekućina se razdvaja na mjestima koja sadrže plinovitu nečistoću. Kada je negativni tlak dovoljno velik, udaljenost između molekula tekućine premašuje maksimalnu molekularnu udaljenost potrebnu za držanje molekula u kontaktu, tekućina se raspada, stvarajući praznine. Ove praznine, tj. mjehurići, nazivaju se kavitacije (kavitacijski mjehurići). Plin se nakuplja u mjehurićima koji kontinuirano rastu putem mehanizma rektifikacijske difuzije dok ne dosegnu

kritičnu rezonantnu veličinu, što ovisi o primijenjenoj frekvenciji (Chavan i sur., 2022). Kavitacija je, dakle, pojava koja obuhvaća stvaranje, širenje i imploziju mjehurića plina (Tiwari, 2015). Na kavitaciju utječu fizikalna svojstva otapala, kao što su viskoznost, površinska napetost i tlak zasićene pare. Nadalje, nakon pucanja kavitacijski mjehurići oslobađaju energiju u obliku topline koja pospješuje prijenos mase (Picot-Allain i sur., 2021). Procjenjuje se da kolabiranje svakog mjehurića može lokalno stvoriti temperaturu od 4500-5000 K i tlak veći od 1000 atm (Chavan i sur., 2022).

Osim za ekstrakciju, ultrazvuk se u prehrambenoj industriji koristi i za inaktivaciju mikroorganizama, ultrazvučno rezanje, ultrazvučno sušenje, zamrzavanje, ultrazvučno pjenjenje i uklanjanje pjene (Chavan i sur., 2022). Ultrazvuk je često korištena jedinična operacija u prehrambenoj industriji zbog svojih brojnih pozitivnih strana, a neke od njih kao što su mehanički učinci generirani ultrazvukom, turbulencijom, udarnim valovima, mikrostrujanjem povećavaju prijenos mase unutar medija što može pozitivno utjecati na kemijske reakcije i druge procese. Ultrazvučni valovi su netoksični, sigurni i benigni za okoliš, a ultrazvuk ima i sposobnost pokretanja reakcija bez upotrebe vanjskih kemikalija (vanjski reagensi nisu potrebni jer mjehurići koji kolabiraju stvaraju radikale koji mogu provoditi redoks reakcije), dok hrana tretirana ultrazvukom ima minimalne gubitke boje, okusa, nutritivnih sastojaka (Chavan i sur., 2022).

Danas postoji širok raspon uređaja za ultrazvuk, a izbor opreme ovisi o njezinoj konačnoj namjeni. Najdostupnija vrsta uređaja za generiranje ultrazvuka je ultrazvučna kupelj. Ekstrakcija ultrazvukom visokog intenziteta može biti direktna (ultrazvučna sonda) ili indirektna (ultrazvučna kupelj). Ultrazvučna kupelj pogodna je za ultrazvuk nižeg intenziteta i koristi se u rasponu frekvencija od 40-100 kHz. Sastoji se od posude izrađene od nehrđajućeg čelika, koja sadrži jedan ili više uređaja za pretvaranje ultrazvučne energije smještenih na dnu. Veličine kupelji variraju od manjih od 1 L pa do industrijskih od 1000 L (Paniwnyk i sur., 2017). Prednosti ovih kupelji su niska cijena, laka dostupnost i mogućnost tretiranja velikog broja uzoraka, a nedostaci su niža ponovljivost i snaga ultrazvuka koja se prenosi na uzorak, u odnosu na ultrazvučni uređaj, odnosno ultrazvuk sa sondom. Ultrazvučni uređaj sa sondom sadrži sondu koja se direktno uranja u uzorak zbog čega dolazi do izravnog prijenosa ultrazvučnih valova u medij s minimalnim gubitkom ultrazvučne energije. Posljedično, a u usporedbi sa ultrazvučnom kupelji, ultrazvučni uređaj sa sondom djeluje jačim intenzitetom na uzorak (Dzah i sur., 2020)

2.5.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija se oslanja na potiskivanje tekućine u biljni materijal kako bi se povećao prinos željenih spojeva te tome više pogoduju mehanički učinci ultrazvuka (Paniwnyk i sur., 2017). Tijekom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, kavitacija, toplinski i mehanički učinci povezani s ultrazvukom uzrokuju pucanje stanične stijenke, smanjuju veličinu čestica, uzrokuju degradaciju biljnog matriksa i povećavaju prijenos mase, bez modificiranja strukture i funkcije ekstrakata (Picot-Allain i sur., 2021). Toplina koja se oslobađa u procesu može oštetiti osjetljive i termolabilne spojeve pa je sustav često potrebno hladiti tijekom procesa. Upravo zbog odvijanja procesa na nižim temperaturama ova metoda ekstrakcije je pogodna za ekstrakciju osjetljivih spojeva (Picot-Allain i sur., 2021). Primjena ultrazvuka u ekstrakciji vrijednih komponenti ima potencijal jer je u usporedbi s drugim konvencionalnim postupcima ekstrakcije jednostavna, učinkovita i ekonomična (Kulkarni i Rathod, 2014).

Kao što je već ranije spomenuto, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom bolji je izbor u odnosu na konvencionalne metode zbog kraćeg vremena trajanja ekstrakcije te je ekološki prihvatljivija jer se ekstrakcija može provesti bez upotrebe štetnih i opasnih otapala ili uz manji utrošak istih. Primjerice, ekstrakcija enzima potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta povećava prinos ekstrakcije, brzinu ekstrakcije, a također se dobiva i ekstrakt bolje kvalitete zbog korištenja manje štetnih otapala (Chavan i sur., 2022). Ultrazvuk visokog intenziteta može ubrzati prijenos topline i mase u raznovrsnim matriksima i uspješno se koristi za ekstrakciju raznovrsnih komponenti (Li i sur., 2004). Intenziviranje prijenosa mase i lakši pristup otapala biljnoj stanici dovodi do kolapsa kavitacijskih mjehurića u blizini staničnih stijenki, što posljedično dovodi do erozije stanične stijenke, boljeg kontakta s otapalom i u konačnici bolje ekstrakcije (Toma i sur., 2001).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Ekperimentalni dio ovog rada proveden je u tri faze. U prvoj fazi provedene su toplinske i ultrazvučno potpomognute ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz lista šećerne repe. Druga faza obuhvaćala je fizikalno-kemijske analize na dobivenim ekstraktima, a u trećoj je odrađena statistička obrada dobivenih rezultata.

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Suhi list šećerne repe

Ekperimenti su provedeni na suhom listu šećerne repe koji je dobiven od projektnih partnera iz Turske. List šećerne repe je dodatno usitnjen (Slika 3) kako bi se osigurala veća površina ekstrakcije te samim time i bolja ekstrakcija. Usitnjeni uzorak šećerne repe zatim se vagao i u njega se dodavalo otapalo (0,1 mM NaOH). Na tako pripremljenim uzorcima provodila se toplinska i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta.



Slika 3. Usitnjeni list šećerne repe (*vlastita fotografija*)

3.1.1.1. Označavanje uzoraka

Pripremljeno je ukupno 12 uzoraka. Od toga je 9 uzoraka podvrgnuto ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta, a preostala 3 uzorka su podvrgnuta toplinskoj ekstrakciji. Uzorci podvrgnuti ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta tijekom same ekstrakcije ultrazvukom su hlađeni ledom, budući se djelovanjem ultrazvuka oslobađa energija koja dovodi do zagrijavanja, a previsoka temperatura može dovesti do denaturacije proteina. Također, praćena je i temperatura kupelji u procesu toplinske ekstrakcije, kako bi se svi uzorci održali na istoj temperaturi i kako bi se odbacio mogući utjecaj temperature na rezultate. Nomenklatura uzoraka prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. Nomenklatura uzoraka podvrgnutih ekstrakcijama i njihova značenja

NAZIV	ZNAČENJE
LUN	Suhi uzorak lista šećerne repe, hlađen, tretiran ultrazvukom visokog intenziteta
LN	Suhi uzorak lista šećerne repe podvrgnut toplinskoj ekstrakciji

Nadalje, uzorcima su, uz gore navedene oznake, pridruženi i brojevi kojima su obilježeni način tretiranja i određeni parametri prilikom tretiranja. Pridruženi brojevi i njihovo značenje prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Pridruženi brojevi uzoraka i njihovo značenje

BROJČANA OZNAKA UZORKA	ZNAČENJE
1-9	Uzorci tretirani ultrazvukom visokog intenziteta uz 9 različitih kombinacija amplitude ultrazvuka i vremena tretmana
/3, /6, /9	Uzorci podvrgnuti toplinskoj ekstrakciji pri 60 °C u vremenu od 3, 6 i 9 minuta

3.1.2. Kemikalije i standardi

1. Deionizirana voda (PBF, Zagreb, Hrvatska)
2. 0,1 M otopina natrijeva hidroksida (NaOH) koja se priprema na sljedeći način: odvaži se 0,8000 g natrijeva hidroksida (Lach-Ner, Neratovice, Češka) i kvantitativno se uz pomoć lijevka prenese u odmjernu tikvicu od 200 mL. Odmjerna tikvica se nadopuni do oznake deioniziranom vodom i promiješa.
3. 0,1 mM otopina NaOH koja se priprema na sljedeći način: u odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetira se 0,1 mL 0,1 M otopine NaOH. Odmjerna tikvica se nadopuni do oznake deioniziranom vodom i promiješa.
4. Reagens A 2 % Na₂CO₃ u 0,1 M NaOH za metodu određivanja ukupnih proteina po Lowry-u koji se priprema na sljedeći način: odvaži se 4,0000 g bezvodnog natrijeva karbonata (KT.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska), kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 200 mL. Odmjerna tikvica se nadopuni do oznake prethodno pripremljenom 0,1 M otopinom natrijeva hidroksida i promiješa.
2. 1 % -tna otopina K-Na – tartarata, za metodu određivanja ukupnih proteina po Lowry-u, koja se priprema na sljedeći način: odvaži se 0,0800 g K-Na-tartarata (Lach-Ner, Neratovice, Češka) i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL. Odmjerna tikvica se nadopuni do oznake deioniziranom vodom i promiješa.

3. Reagens B 0,5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ u 1 % K,Na – tartaratu za metodu određivanja ukupnih proteina po Lowry-u koji se priprema na sljedeći način: odvaži se 1,0 g bakrova (II) sulfata pentahidrata, kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 200 mL. Odmjerna tikvica se nadopuni do oznake prethodno pripremljenom otopinom K-Na-tartarata i promiješa.
4. Reagens C, za metodu određivanja ukupnih proteina po Lowry-u, koji se priprema na sljedeći način: reagens B i reagens A se pomiješaju u omjeru 1:50.
5. Galna kiselina (Acros Organics, New Jersey, SAD)
6. Standard goveđeg serumskog albumina (eng. *bovine serum albumin*, BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD).
7. 40 mM vodena otopina klorovodične kiseline (HCl) (Carlos Erba reagents, Val-de-Reuil, Francuska) koja se priprema na sljedeći način: 330 μL 12 M HCl (konc. HCl = 37 %) razrijedi se u odmjernoj tikvici od 100 mL destiliranom vodom te nadopuni do oznake.
8. 0,3 M acetatni pufer (pH 3,6) koji se priprema na sljedeći način: 1,55 g natrijevog acetata trihidrata ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) (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.
9. 20 mM otopina željezovog(III)-klorida (FeCl_3) koja se priprema na sljedeći način: 0,0541 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (GRAM MOL, Zagreb, Hrvatska) otopi se u 10 mL destilirane vode, otopina se priprema svježa.
10. 10 mM otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) koja se priprema na sljedeći način: 0,0312 g TPTZ (ACROSS ORGANICS, Geel, Belgija) otopi se u odmjernoj tikvici od 10 mL sa 40 mM HCl te se istom klorovodičnom kiselinom nadopuni do oznake. Otopina se uvijek priprema svježa, tj. na dan određivanja.
11. Standard željezo (II)-sulfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) koji se priprema na sljedeći način: odvaži se 0,139 g željezo (II)-sulfat heptahidrata (Honeywell Fluka, Seelze, Njemačka) u plastičnoj ladici za vaganje i kvantitativno prenese s destiliranom vodom u odmjernu tikvicu volumena 0,5 L te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
12. FRAP reagens, za postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti spojeva FRAP metodom, koji se priprema na sljedeći način: pomiješa se 50 mL 0,3 M acetatnog pufera, 5 mL TPTZ reagensa (ACROSS ORGANICS, Geel, Belgija) i 5 mL FeCl_3 (omjer 10:1:1).
13. Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska) potrebno je razrijediti s deioniziranom vodom u omjeru 1:2

14. 20 %-tna otopina natrijeva karbonata (Na_2CO_3) koja se priprema na sljedeći način: u 160 mL vruće destilirane vode otopi se 40 g bezvodnog natrijeva karbonata (KT.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska), a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 200 mL i nakon 24 h filtrira. Otopinu je potrebno pripremiti dan prije.
15. 0,094 mM 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil DPPH (ABCR, Karlsruhe, Njemačka) u 96 % metanolu (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska) koji se priprema na sljedeći način: 7,41 mg DPPH otopi se 96 % metanolu u odmjernoj tikvici od 200 mL te nadopuni do oznake metanolom.
16. Standard 1 mM Trolox (ACROSS ORGANICS, Geel, Belgija), za postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti spojeva DPPH metodom, koji se priprema na sljedeći način: 0,025 g Troloxa otopi se 96 % metanolu u odmjernoj tikvici od 100 mL te nadopuni do oznake metanolom.

3.1.3. Uređaji i pribor

3.1.3.1. Uređaji

1. Analitička vaga NBL-254i Nimbus (Adam Equipment Inc., Oxford, SAD)
2. pH metar HI5521-02 (Hanna Instruments Inc., Zagreb, Hrvatska)
3. Ultrazvučna kupelj DT 100 H s grijanjem (Bandelin, Berlin, Njemačka)
4. Ultrazvučni uređaj Q700CA Sonicator (Qsonica, Newtown, SAD)
5. UV-VIS Spektrofotometar UV-2600i s opcijskom ISR2600Plus integrirajućom sferom i programskom podrškom LabSolutions UV-Vis (Shimadzu, Kyoto, Japan)
6. Vakuum pumpa Rocker 300 (Witeg, Wertheim, Njemačka)
7. Vortex uređaj MX-S (Dlab, Peking, Kina)
8. Tehnička vaga Highland® HCB 1002 (Adam Equipment, Milton Keynes, UK)
9. Testna (klima) komora HPP110 (Mettler GmbH, Schwabach, Njemačka)

3.1.3.2. Pribor

1. Odmjerne tikvice (10 mL, 100 mL, 200 mL)

2. Staklene epruvete
3. Stalak za epruvete
4. Odsisna boca
5. Büchnerov lijevak
6. Celulozni filter papir
7. Stakleni lijevci
8. Staklena kapaljka
9. Propipeta
10. Automatska pipeta Gilson (200 μ L, 1000 μ L, 5 mL)
11. Staklene čaše (250 mL)
12. Plastične epruvete tipa Falcon (50 mL, 15 mL)
13. Plastične „lađice“
14. Laboratorijska žlica
15. Špatula
16. Menzura (100 mL)
17. Staklene boce (500 mL, 1L)
18. Termometar
19. Plastične kivete
20. Plastična posuda
21. Eksikator
22. Staklene posudice

3.2. METODE

3.2.1. Konvencionalna toplinska ekstrakcija fenolnih spojeva i proteina

U prvoj fazi eksperimentalnog dijela provedene su konvencionalne toplinske ekstrakcije fenolnih spojeva i proteina. Provođene su pri istoj temperaturi (60 °C) za sva 3 uzorka, ali kroz različito vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min) toplinom. Toplinske ekstrakcije odrađene su na 3 uzorka, a točni nazivi, kao i parametri za svaki pojedini uzorak navedeni su u Tablici 3.

Tablica 3. Nazivi uzoraka i parametri toplinske ekstrakcije

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

3.2.1.1. Postupak provođenja konvencionalne toplinske ekstrakcije

Ekstrakcija je provođena u ultrazvučnoj kupelji DT 100 H s grijanjem u kojoj je mogućnost soniciranja prilikom izvođenja ekstrakcija bila isključena. Ultrazvučna kupelj se napuni vodom do oznake te se namjesti željena temperatura (60 °C) te se termometrom prati porast temperature. Uzorci se pripreme na način da se u laboratorijsku čašu od 250 mL odvaže $2,00 \pm 0,10$ g usitnjenog suhog lista šećerne repe te se doda 100 mL 0,1 mM NaOH. Nakon što se u ultrazvučnoj kupelji i u uzorcima postigne željena temperatura, uzorci se postave u kupelj te se onda počinje mjeriti vrijeme ekstrakcije (3, 6 ili 9 min) uz povremeno miješanje. Po završetku ekstrakcije slijedi vakuum filtracija uzoraka. Ona je provođena na način da se na vrh odsisne boce stavi Büchnerov lijevak s filter papirom, na odsisnu bocu se crijevom spoji vakuum pumpa Rocker 300 (Witeg, Wertheim, Njemačka) te se na filter papir u Büchnerovom lijevku izlije ekstrakt, a pumpa uključi. Dobiveni filtrat prebacuje se u plastične epruvete tipa Falcon od 50 mL, mjeri mu se pH vrijednost pomoću pH metra HI5521-02 (Hanna Instruments Inc., Zagreb, Hrvatska) i električna vodljivost [mS/cm] (pH metar HI5521-02 (Hanna Instruments Inc., Zagreb, Hrvatska)), a potom se u filtratu spektrofotometrijski određuje koncentracija ukupnih proteina, fenolnih spojeva te antioksidacijska aktivnost uzoraka.

3.2.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta

Na suhom listu šećerne repe provođena je i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta. Za provođenje ovog dijela eksperimenta korišten je ultrazvučni uređaj Q700CA Sonicator (20 kHz) (Qsonica, Newtown, SAD) s promjerom ultrazvučne sonde od 12 mm.

Tretmani ultrazvukom izvršeni su pri različitim amplitudama ultrazvuka (50, 75 i 100 %) tijekom različitog vremena tretiranja (3, 6 i 9 min), a točni nazivi i parametri za svaki uzorak prikazani su u Tablici 4. Tijekom ekstrakcije mjerena je temperatura sustava, koja nije smjela prelaziti 40 °C, kako ne bi došlo do denaturacije proteina. Kada bi temperatura bila blizu 40 °C, u plastičnu posudu u koju je uronjena čaša s uzorkom bi se dodavalo još leda kako bi se spustila temperatura.

Tablica 4. Nazivi uzoraka i parametri ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta

NAZIV UZORKA	AMPLITUDA [%]	VRIJEME [min]
LUN 1	75	6
LUN 2	75	3
LUN 3	50	6
LUN 4	50	9
LUN 5	75	9
LUN 6	100	9
LUN 7	50	3
LUN 8	100	6
LUN 9	100	3

3.2.2.1. Postupak provođenja ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta

Uzorci za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom visokog intenziteta se pripremaju na isti način kao i kod toplinske ekstrakcije, tako da se u laboratorijsku čašu od 250 mL odvaži $2,00 \pm 0,01$ g usitnjenog suhog lista šećerne repe te se doda 100 mL 0,1mM NaOH. U plastičnu posudu s usitnjenim ledom postavi se laboratorijska čaša s uzorkom. Posuda s ledom i čašom s uzorkom se stavlja u kućište ultrazvučnog (Slika 4) uređaja te se u čašu s uzorkom uranja ultrazvučna sonda na način da je postavljena u središtu čaše i uronjena oko 2,5 cm u uzorak, ali ne dodiruje dno, ni stijenke čaše. U čašu s uzorkom se uranja i termočlanak pomoću kojeg pratimo temperaturu tijekom ekstrakcije te se i on uranja na način da ne dodiruje stijenke čaše,

ni ultrazvučnu sondu. Kućište ultrazvučnog uređaja se zatvori i na LCD zaslonu upravljačke jedinice, unose se odgovarajući parametri za ekstrakciju (Tablica 4). Ekstrakti dobiveni nakon provedene ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta se filtriraju na isti način kao i kod toplinske ekstrakcije – vakuum filtracijom, a izdvojeni filtrat se prebacuje u plastične epruvete tipa Falcon od 50 mL. Ekstraktu se mjere pH i električna vodljivost [mS/cm] pomoću pH metra HI5521-02 , a potom se određuju i ukupni proteini, fenoli te antioksidacijska aktivnost.



Slika 4. Kućište ultrazvuka visokog intenziteta korištenog za ekstrakciju (*vlastita fotografija*)

3.2.3. Određivanje koncentracije ukupnih fenolnih spojeva

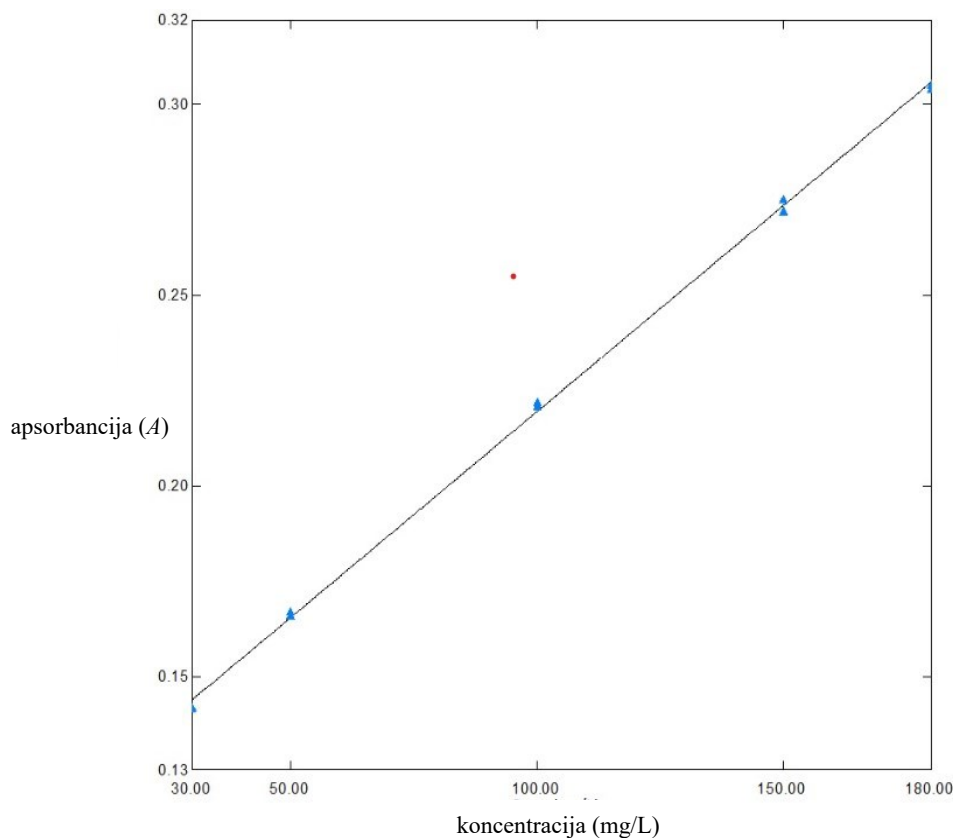
Metoda određivanja koncentracije ukupnih fenolnih spojeva temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenolni spojevi). Folin-Ciocalteu reagens (smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline) reagira s fenoksid-ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenih volframovih i molibdenovih oksida. Nakon dva sata reakcije u tami u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na 765 nm (Ough i Amerine, 1988) pri čemu je intenzitet obojenja direktno proporcionalan koncentraciji fenolnih spojeva u ispitivanom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

3.2.3.1. Postupak određivanja koncentracije ukupnih fenolnih spojeva

U staklenu epruvetu se pomoću automatske pipete otpipetira 7,9 mL destilirane vode, 0,1 mL uzorka (prethodno dobiveni ekstrakt) te 0,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog s vodom u omjeru 1:2), promiješa na vortex uređaju i doda 1,5 mL 20 %-tne otopine natrijeva karbonata (Na_2CO_3). Sve se još jednom dobro promiješa na vortex uređaju. Tako pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 sata na sobnoj temperaturi u tami, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm u odnosu na slijepu probu. Apsorbancija se mjeri na UV-VIS spektrofotometru UV-2600i. Slijepa proba priprema se na isti način kao i ispitivani uzorci, s razlikom da se umjesto uzorka u reakcijsku smjesu dodaje jednaki volumen destilirane vode. Apsorbancija se mjeri na način da se prvo izmjeri apsorbancija slijepa probe, a potom uzorcima. Izmjerene vrijednosti apsorbancije analiziraju se uz pomoć LabSolutions™ UV-Vis programa. Svim uzorcima koncentracija ukupnih fenola određena je u paraleli. Iz dobivenih vrijednosti apsorbancija izračunata je srednja vrijednost te se rezultat konačno izražavao s obzirom na udio suhe tvari (s.tv.) lista šećerne repe [$\text{mg/g}_{\text{s.tv.}}$]. Izražavanju konačnog rezultata kao koncentracije ukupnih fenola s obzirom na udio suhe tvari prethodi određivanje koncentracije iz baždarnog dijagrama.

3.2.3.2. Postupak izrade baždarnog dijagrama

Kako bi se odredila nepoznata koncentracija ukupnih fenolnih spojeva prisutnih u uzorcima, potrebno je prethodno izraditi baždarni dijagram. Baždarni dijagram je dijagram ovisnosti apsorbancije o poznatoj koncentraciji standarda. Iz osnovne otopine standarda galne kiseline koncentracije 1000 mg/L, u odmjerne tikvice od 50 mL pripreme se sljedeća razrjeđenja: 30, 50, 100, 150 i 180 mg/L. U staklenu epruvetu se pomoću automatske pipete otpipetira 7,9 mL destilirane vode, 0,1 mL prethodno pripremljenih razrjeđenja galne kiseline te 0,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog s vodom u omjeru 1:2), promiješa na vortex uređaju i doda 1,5 mL 20 %-tne otopine natrijeva karbonata (Na_2CO_3). Sve se još jednom dobro promiješa na vortex uređaju. Tako pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 sata na sobnoj temperaturi u tami, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm. Na osnovu dobivenih vrijednosti apsorbancija, izradi se baždarni dijagram (Slika 5). Pomoću jednadžbe pravca [1], a na temelju izmjerene apsorbancije izračunava se nepoznata koncentracija ukupnih fenola u uzorcima. Dobiveni rezultati se izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline (eng. *gallic acid equivalent*, GAE) (mg GAE/L).



Slika 5. Baždarni dijagram (prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline)

Jednadžba prema kojoj se izračunava koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u uzorcima glasi:

$$Y = 0,00107826 X + 0,111618 \quad [1]$$

$$R^2 = 0,99929$$

gdje je:

Y = apsorbancija pri 765 nm

X = ekvivalent GAE (mg/L)

R² = koeficijent determinacije

3.2.4. Određivanje koncentracije ukupnih proteina po Lowryu

Metoda određivanja proteina po Lowry-u kolorimetrijska je metoda koja se temelji na reaktivnosti peptidnog dušika s Cu²⁺ u alkalnim uvjetima i naknadnoj redukciji s Folin-Ciocalteu reagensom. Točnije, –CO-NH- veza u polipeptidnom lancu reagira s bakrenim sulfatom u alkalnom mediju dajući kompleks s proteinom (Cu⁺-protein) plave boje. Nastali

kompleks reagira s Folin-Ciocalteu reagensom, koji sadrži fosfomolibdensku i fosfovolframatnu kiselinu, što dovodi do njihove redukcije u molibdenov i volframov oksid te posljedično do plavičastog obojenja, čiji je intenzitet proporcionalan apsorbanciji (Mahesha, 2012). Nastali intenzitet plavog obojenja mjeri se spektrofotometrijski pri 740 nm.

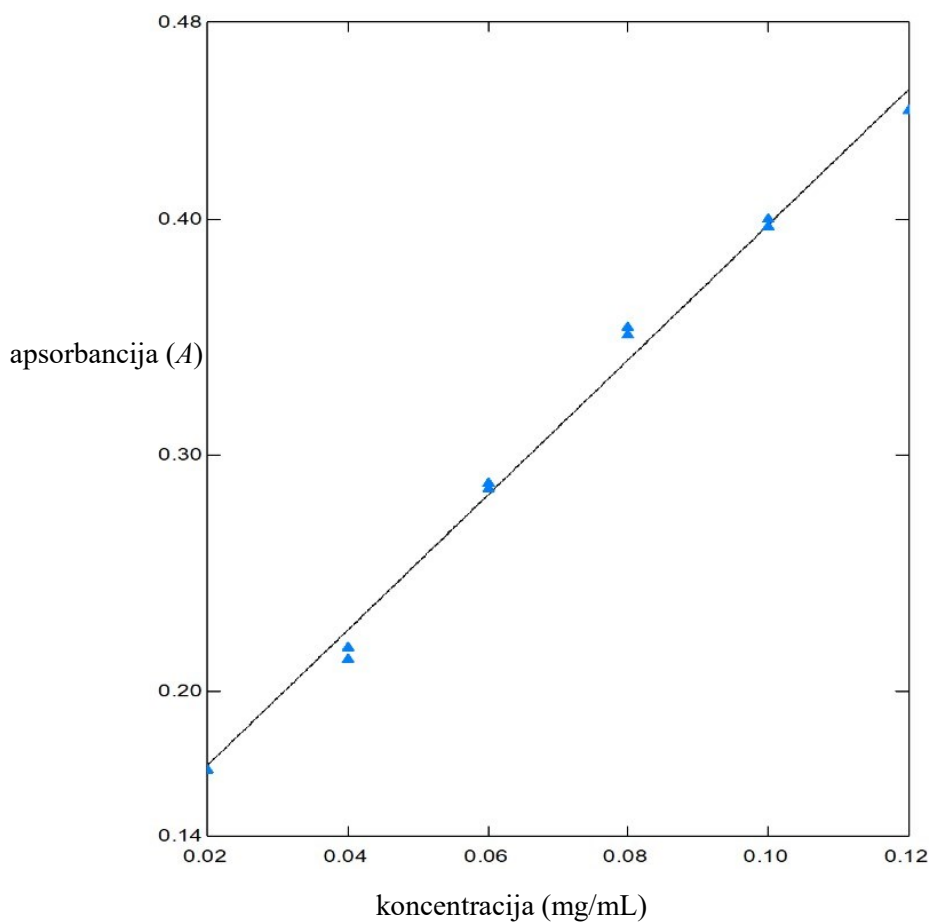
3.2.4.1. Postupak određivanja koncentracije ukupnih proteina po Lowryu

U staklenu epruvetu se automatskom pipetom otpipetira 0,4 mL razrijeđenog uzorka (prethodno dobiveni ekstrakt koji je razrijeđen 10 puta) i 4 mL reagensa C. Sadržaj epruvete se potom dobro promiješa pomoću vortex uređaja i ostavi se na sobnoj temperaturi u mraku 10 do 15 minuta kako bi došlo do odvijanja kemijske reakcije. Potom se naglo dodaje 0,2 mL Folin-Ciocalteu reagens uz snažno miješanje na vortex uređaju. Budući da je Folin-Ciocalteu reagens u jako lužnatoj otopini (reagens C) nestabilan mora se dodati naglo i uz intenzivno miješanje. Dobivena smjesa se zatim ostavi na sobnoj temperaturi u tami 40-60 minuta kako bi došlo do reakcije i razvoja obojenja. Važno je da se mjerenje apsorbancije provede u spomenutom intervalu od 40-60 minuta jer je obojenje postojano unutar tog intervala. Apsorbancija se mjeri pri 740 nm na UV-VIS spektrofotometru UV-2600i. Osim uzoraka, pripremljena je i slijepa proba koja umjesto razrijeđenog uzorka sadrži 0,4 mL ekstrakcijskog otapala, odnosno 0,4 mL 0,1 mM NaOH. Izmjerene vrijednosti apsorbancije analiziraju se uz pomoć LabSolutions™ UV-Vis programa. Svim uzorcima koncentracija ukupnih proteina određena je u paraleli. Iz dobivenih vrijednosti apsorbancija izračunata je srednja vrijednost te se rezultat konačno izražavao s obzirom na udio suhe tvari (s.tv.) lista šećerne repe [mg/g_{s.tv.}]. Izražavanju konačnog rezultata kao koncentracije ukupnih proteina s obzirom na udio suhe tvari prethodi određivanje koncentracije iz baždarnog dijagrama.

3.2.4.2. Postupak izrade baždarnog dijagrama

Kako bi se mogla odrediti nepoznata koncentracija nekog proteina ili smjese proteina u otopini, potrebno je prethodno konstruirati baždarni dijagram, tj. dijagram ovisnosti apsorbancije o poznatoj koncentraciji proteina (standard goveđeg serumskog albumina). Iz osnovne, standardne otopine BSA koncentracije 200 mg/mL u odmjerne tikvice od 10 mL pripreme se sljedeća razrjeđenja: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1 te 0,12 mg/mL. U staklenu epruvetu se automatskom pipetom otpipetira 0,4 mL prethodno pripremljenih otopina standarda BSA i 4 mL reagensa C. Sadržaj epruvete se potom dobro promiješa pomoću vortex uređaja i ostavi se

na sobnoj temperaturi u tami 10 do 15 minuta kako bi došlo do provedbe kemijske reakcije. Potom se naglo dodaje 0,2 mL Folin-Ciocalteu reagensa uz snažno miješanje na vortex uređaju. Dobivena smjesa se zatim ostavi na sobnoj temperaturi u tami 40-60 minuta kako bi došlo do reakcije i razvoja obojenja. Nastalo plavičasto obojenje mjeri se spektrofotometrijski pri 740 nm. Na osnovu dobivenih vrijednosti apsorbancija, izradi se baždarni dijagram (Slika 6). Pomoću jednadžbe pravca [2], a na temelju izmjerene apsorbancije izračunava se nepoznata koncentracija ukupnih proteina u uzorcima. Dobiveni rezultati se izražavaju kao ekvivalenti BSA (mg/mL).



Slika 6. Baždarni dijagram (prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA standarda)

Jednadžba prema kojoj se izračunava koncentracija ukupnih proteina u uzorcima glasi:

$$Y = 2,87376 X + 0,110804 \quad [2]$$

$$R^2 = 0,99235$$

gdje je:

Y = apsorbancija pri 740 nm

X = ekvivalent BSA (mg/mL)

R^2 = koeficijent determinacije

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Ova metoda temelji se na redukciji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u otopini metanola. DPPH radikal ima nespareni elektron koji uzrokuje snažnu apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm), dok u prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji „gasi“ slobodne radikale) dolazi do stabilizacije DPPH radikala sparivanjem elektrona te do promjene ljubičaste boje (oksidirani oblik radikala) otopine u žutu (reducirani oblik radikala), što se mjeri promjenom apsorbanije reakcijske smjese u definiranom vremenu u odnosu na isti učinak koji se postiže s poznatim reducensom (Trolox) (Brand-Williams i sur., 1995).

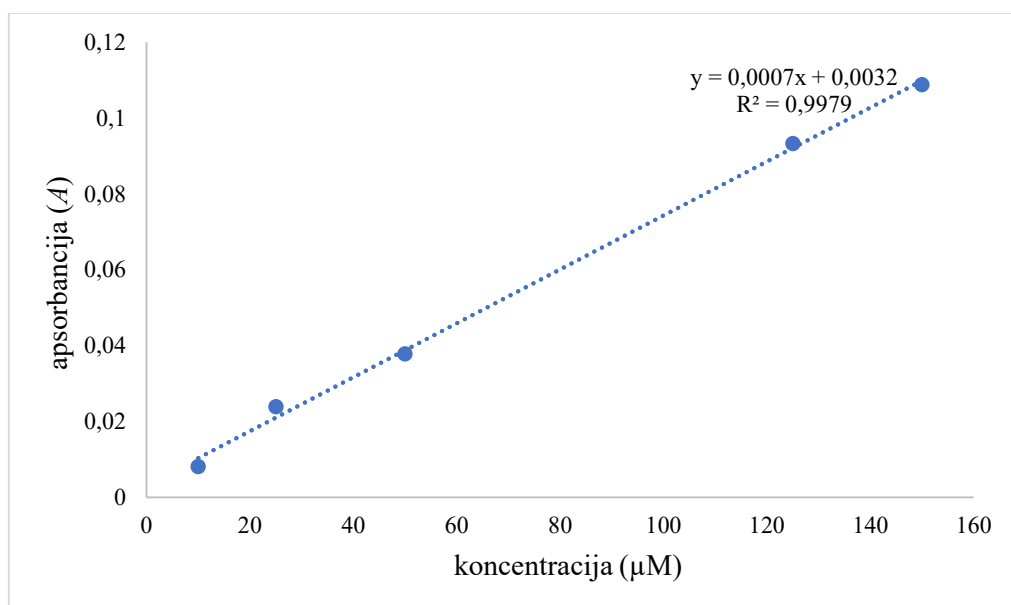
3.2.5.1. Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

U epruvetu se automatskom pipetom otpipetira 100 μ L uzorka (prethodno dobiveni ekstrakt) i doda 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH te dobro promiješa na vortex uređaju. Reakcija se odvija 30 minuta (vrijeme potrebno da se postigne ravnotežno stanje) u tami nakon čega se mjeri apsorbanija. Apsoorbancija se mjeri pri 515 nm na UV-VIS spektrofotometru UV-2600i. Osim uzoraka, pripremljena je i slijepa proba koja umjesto uzorka sadrži 100 μ L metanola. Izmjerene vrijednosti apsorbanije analiziraju se uz pomoć LabSolutions™ UV-Vis programa. Svim uzorcima antioksidacijska aktivnost DPPH metodom određena je u paraleli. Iz dobivenih vrijednosti apsorbanija izračunata je srednja vrijednost te se rezultat konačno izražavao s obzirom na udio suhe tvari (s.tv.) lista šećerne repe [μ M/g_{s.tv.}]. Izražavanju konačnog rezultata kao antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom s obzirom na udio suhe tvari prethodi određivanje koncentracije iz baždarnog dijagrama.

3.2.5.2. Postupak izrade baždarnog dijagrama

Kako bi se mogla odrediti antioksidacijska aktivnost uzoraka, potrebno je prethodno konstruirati baždarni dijagram, odnosno dijagram koji prikazuje ovisnost apsorbanije o poznatoj vrijednosti koncentracija Trolox-a. Iz osnovne otopine standarda Trolox-a koncentracije 1 mM, u odmjerne tikvice od 10 mL pripreme se sljedeća razrjeđenja: 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 125 μ M i 150 μ M, na način da se redom otpipetira: 100 μ L; 250 μ L; 500 μ L; 1250 μ L i 1500 μ L ishodne otopine i nadopuni do oznake 96 % metanolom. U epruvetu se

automatskom pipetom otpipetira 100 μL prethodno pripremljenih otopina standarda Trolox-a i doda 3,9 mL 0,094 mM otopine DPPH te dobro promiješa na vortex uređaju. Reakcija se odvija 30 minuta (vrijeme potrebno da se postigne ravnotežno stanje) u tami nakon čega se mjeri apsorbancija pri 515 nm. Na osnovu dobivenih vrijednosti apsorbancija, izradi se baždarni dijagram (Slika 7). Promjena apsorbancije DPPH radikala nakon reakcije s uzorkom računa se oduzimanjem apsorbancije uzorka (A) od apsorbancije slijepe probe (A_0). Pomoću jednadžbe pravca [3], a na temelju izmjerene apsorbancije izračunava se nepoznati antioksidacijski kapacitet u uzorcima. Dobiveni rezultati se izražavaju kao ekvivalenti Trolox-a (μM).



Slika 7. Baždarni dijagram (prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji Trolox standarda)

Jednadžba prema kojoj se izračunava antioksidacijska aktivnost u uzorcima glasi:

$$Y = 0,0007 X + 0,0032 \quad [3]$$

$$R^2 = 0,9979$$

gdje je:

Y = apsorbancija pri 515 nm

X = ekvivalent Trolox-a (μM)

R^2 = koeficijent determinacije

3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

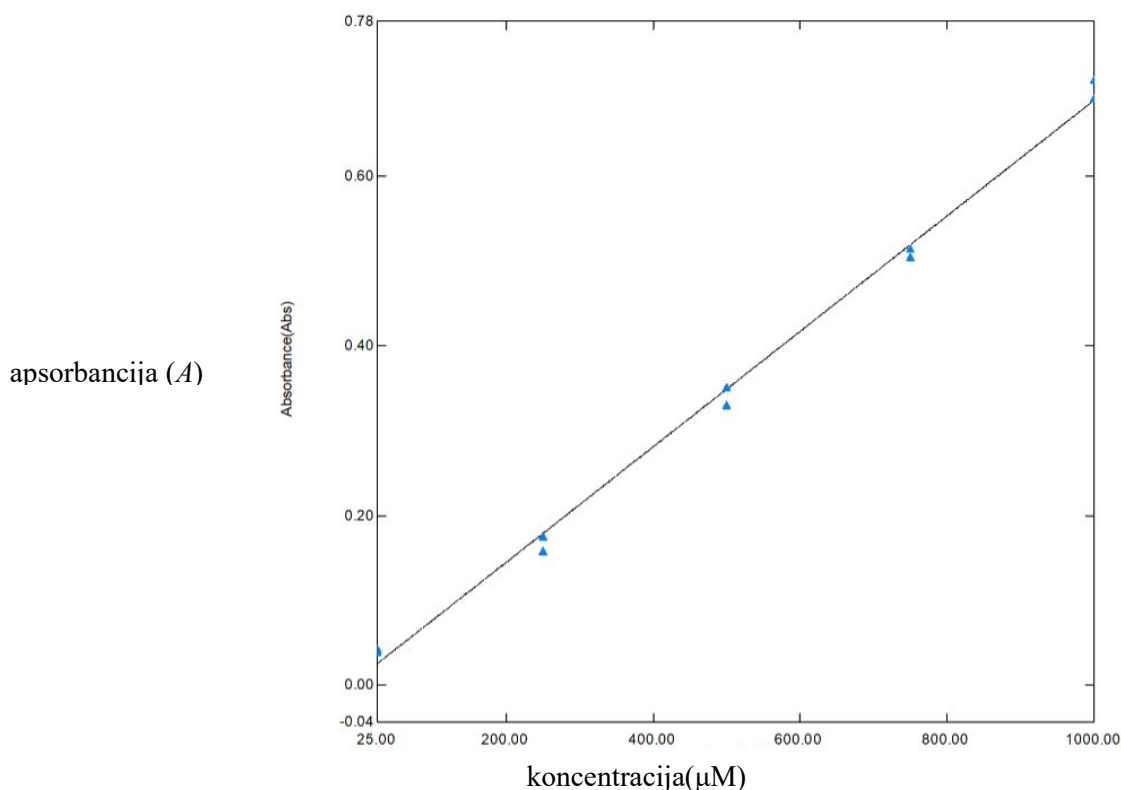
Metoda se bazira na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) u prisustvu antioksidansa pri čemu nastaje plavo obojeni produkt. Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri pH=3,6 kako bi se zadržala dobra topljivost željeza. Pri nižim pH vrijednostima smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno će se povećati redoks potencijal, koji će dodatno omogućiti pomak reakcije u smjeru transfera elektrona. Redoks potencijal reakcije Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77V i svi spojevi sa nižim redoks potencijalom, reducirat će željezo te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijske aktivnosti. Metoda se zapravo temelji na sposobnosti antioksidansa iz uzorka da reducira Fe³⁺ ione u Fe²⁺ ione u otopini 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri nižem pH. Redukcija se prati mjerenjem promjene apsorbancija pri 595 nm. Rezultati su izraženi kao μmol Fe²⁺ ekvivalenta (FE)/mL uzorka.

3.2.6.1. Postupak određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

U staklene epruvete redom se automatskom pipetom otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka (prethodno razrijeđenog 5 puta) i 2080 μL FRAP reagensa, dobro se promiješa na vortex uređaju te 5 minuta termostatira na temperaturi 37 °C (ultrazvučna kupelj). Osim uzorka, priprema se i slijepa proba. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg se dodaje ekstrakcijsko otapalo, odnosno 0,1 mM NaOH. Potom se mjeri apsorbancija pri 595 nm na UV-VIS spektrofotometru UV-2600i. Izmjerene vrijednosti apsorbancije analiziraju se uz pomoć LabSolutions™ UV-Vis programa. Svim uzorcima antioksidacijska aktivnost FRAP metodom određena je u paraleli. Iz dobivenih vrijednosti apsorbancija izračunata je srednja vrijednost te se rezultat konačno izražavao s obzirom na udio suhe tvari (s.tv.) lista šećerne repe [μM/g_{s.tv.}]. Izražavanju konačnog rezultata kao antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom s obzirom na udio suhe tvari prethodi određivanje koncentracije iz baždarnog dijagrama.

3.2.6.2. Postupak izrade baždarnog dijagrama

Kako bi se mogla odrediti antioksidacijski kapacitet uzoraka, potrebno je prethodno konstruirati baždarni dijagram, tj. dijagram ovisnosti apsorbancije o poznatoj vrijednosti koncentracija otopine željezo (II) sulfata septahidrata. Za pripremu baždarnog pravca pripremi se 100 mL 1mM otopine željezo (II) sulfata septahidrata od koje se pripreme razrjeđenja u koncentracijama: 25, 250, 500, 750 i 1000 μM na način da se u odmjerne tikvice volumena 10 mL redom otpipetira: 0,25; 2,5; 5, 7,5 i 10 mL alikvot otopine željezo (II) sulfata septahidrata te do oznake nadopuni destiliranom vodom. U odmjerne tikvice od 10 mL redom se otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL otopine standarda i 2080 μL FRAP reagensa, kratko promiješa na vortex uređaju, te 5 minuta termostatira na temperaturi od 37 °C. Po završetku termostatiranja mjeri se apsorbancija pri 595 nm. Na osnovu dobivenih vrijednosti apsorbancija, izradi se baždarni dijagram (Slika 8). Pomoću jednadžbe pravca [4], a na temelju izmjerene apsorbancije izračunava se nepoznati antioksidacijski kapacitet uzoraka. Dobiveni rezultati se izražavaju kao ekvivalenti Fe^{2+} (μM).



Slika 8. Baždarni dijagram (prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji otopine željezo (II) sulfata septahidrata)

Jednadžba prema kojoj se izračunava antioksidacijska aktivnost u uzorcima glasi :

$$Y = 6,81142 \cdot 10^{-4} X + 0,00843793 \quad [4]$$
$$R^2 = 0,99617$$

gdje je:

Y = apsorbancija pri 595 nm

X = ekvivalent Fe^{2+} (μM)

R^2 = koeficijent determinacije

3.2.7. Određivanje ukupne suhe tvari sušenjem lista šećerne repe do konstantne mase

Podatak o udjelu ukupne suhe tvari u suhom listu šećerne repe vrlo je bitan jer se rezultati preračunavaju i izražavaju na g suhe tvari. Određivanje ukupne suhe tvari provedeno je konvencionalnom (klasičnom) laboratorijskom metodom sušenja do konstantne mase koja se temelji na uklanjanju vode isparavanjem, a iz razlike u masi uzorka prije i nakon sušenja se izračunava udio suhe tvari prema jednadžbi [5].

$$\text{suha tvar [\%]} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \cdot 100 \quad [5]$$

gdje je:

m_0 - masa prazne posudice

m_1 - masa posudice s uzorkom prije sušenja

m_2 - masa posudice s uzorkom nakon sušenja

3.2.7.1. Postupak određivanja ukupne suhe tvari sušenjem lista šećerne repe do konstantne mase

Staklene posudice prvo se osuše u klima komori pri 105 °C. Nakon sušenja posudice se izvade i ohlade u eksikatoru (oko 20 min) te im se izvaže masa s točnošću od $\pm 0,0002$ g. U ohlađene i izvagane posudice, izvaže se cca 2,5 g uzorka i stavi u klima komoru na $105 \pm 0,5$

°C, sat vremena. Nakon sušenja, posudice s uzorkom ohlade se u eksikatoru (oko 20 min). Ohlađene posudice s uzorkom se potom važu. Postupke nakon sušenja, hlađenja i vaganja posudica ponavljaju se sve dok razlika nakon dva uzastopna sušenja u razmaku od pola sata ne bude manja od 0,001 g. Mjerenje je odrađeno u paraleli. Ukupna suha tvar izračunata prema jednadžbi [5] izražena je u postotcima.

3.2.8. Statistička obrada podataka

3.2.8.1. Statistička obrada podataka dobivenih nakon toplinske ekstrakcije

Vrijednosti ukupnih fenola, ukupnih proteina, antioksidacijske aktivnosti određivane DPPH i FRAP metodom te pH i električne vodljivosti dobivene nakon provedbe toplinske ekstrakcije, obrađene su u programu Microsoft Excel 365. Kod određivanja statističke značajnosti utjecaja vremena tretiranja (3, 6 i 9 min) na prethodno navedene izlazne vrijednosti korištena je analiza varijance s jednim promjenjivim faktorom ANOVA (engl. *Analysis of Variance*), uz interval pouzdanosti od 95 %.

3.2.8.2. Statistička obrada podataka dobivenih nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta

Vrijednosti ukupnih fenola, ukupnih proteina, antioksidacijske aktivnosti određivane DPPH i FRAP metodom te pH i električne vodljivosti dobivene nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta obrađene su u programu STATGRAPHICS Centurion (Statgraphics Technologies Inc., Virginia, SAD). Korišten je faktorijalni dizajn s više razina utjecaja (engl. Multilevel Factorial Design) kako bi se istražio mogući 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), a izlazne varijable obuhvaćaju ukupne fenole [mg/g_{s.tv}], ukupne proteine [mg/g_{s.tv}], antioksidacijsku aktivnost praćenu DPPH i FRAP metodama [μM/g_{s.tv}], pH te električnu vodljivost [mS/cm]. Također, u programu STATGRAPHICS Centurion napravljena je i multivarijatna analiza varijance MANOVA (engl. *Multivariate analysis of variance*) 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 imaju statistički značajan utjecaj ako je $p < 0,05$, što ukazuje da se značajno razlikuju od nule u intervalu

pouzdanosti od 95,0 %. Nadalje, obradom podataka u programu STATGRAPHICS Centurion izrađeni su Pareto dijagrami koji grafički prikazuju statističku značajnost amplitude i vremena tretiranja (ulazni parametri) na ukupne proteine, ukupne fenole, antioksidacijsku aktivnost, pH i električnu vodljivost (izlazni parametri).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETARA DOBIVENIH NAKON TOPLINSKE I EKSTRAKCIJE POTPOMOŽNUTE ULTRAZVUKOM VISOKOG INTENZITETA

4.1.1. Vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara nakon toplinske ekstrakcije

Tablica 5. Koncentracije ukupnih fenola i ukupnih proteina, antioksidacijska aktivnost (DPPH i FRAP metoda), pH vrijednost i električna vodljivost uzoraka

UZORAK	<i>t</i> (min)	pH*	<i>G</i> [mS/cm]*	Ukupni fenolni spojevi [mg/g _{s.tv.}]**	Ukupni proteini [mg/g _{s.tv.}]**	Antioksidacijska aktivnost	
						DPPH [μM]**	FRAP [μM]**
LN/3	3	6,45 ± 0,02	3,88 ± 0	7,18 ± 0	92,85 ± 1,31	10,96 ± 0,27	127,44 ± 2,28
LN/6	6	6,48 ± 0	5,03 ± 0,01	13,47 ± 1,39	85,64 ± 0,26	16,49 ± 1,55	158,22 ± 6,15
LN/9	9	6,46 ± 0,02	4,92 ± 0,04	10,89 ± 0,17	56,75 ± 1,31	21,77 ± 0,85	156,26 ± 2,08

* rezultati izražen kao srednja vrijednost dvaju uzastopnih mjerenja

** rezultati izraženi kao srednja vrijednost dvaju paralela ± standardna devijacija; udio suhe tvari u uzorku je 94,5 %

t – vrijeme tretiranja uzoraka, *G* – električna vodljivost uzoraka

U Tablici 5 prikazani su rezultati izmjerenih fizikalno-kemijskih parametara, odnosno pH vrijednosti uzoraka, električne vodljivosti uzoraka, koncentracije ukupnih fenola i ukupnih proteina te antioksidacijske aktivnosti spojeva prisutnih u uzorcima koji su tretirani toplinom. Iz navedenih rezultata vidljivo je kako su pH i električna vodljivost uzorka približno jednake kod sva 3 uzorka, neovisno o vremenu njihova tretiranja toplinom. Antioksidacijska aktivnost spojeva u suhom listu šećerne repe mjerena DPPH metodom raste s vremenom tretiranja toplinom, što dovodi do promjene u staničnoj strukturi listova, čime se olakšava difuzija bioaktivnih komponenti i povećava njihova topljivost u otapalu (Galvan d’Alessandro i sur., 2012). S druge strane, koncentracija proteina opada s vremenom tretiranja uzorka toplinom, a uzrok tome može biti dulje izlaganje povišenoj temperaturi koja dovodi do denaturacije proteina. Nadalje, koncentracija ukupnih fenola u ekstraktu i antioksidacijska aktivnost spojeva u suhom listu šećerne repe mjerena FRAP metodom ne pokazuju linearnu ovisnost o trajanju toplinskog tretmana, budući da uzorak LN/6 (vrijeme tretiranja 6 min) ima veće vrijednosti koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti spojeva u odnosu na uzorak LN/9 (vrijeme tretiranja 9 min). Do pada u vrijednostima koncentracije ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti spojeva dužim vremenom tretiranja moglo je doći zbog degradacije fenolnih spojeva i antioksidansa (Yazdankhah i sur., 2019).

4.1.2. Vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta

Tablica 6. Koncentracija ukupnih fenola i ukupnih proteina, antioksidacijska aktivnosti (DPPH i FRAP metoda), pH vrijednost i električna vodljivost uzorka

UZORAK	<i>t</i> [min]	<i>A</i> [%]	pH*	<i>G</i> [mS/cm]*	Ukupni fenolni spojevi [mg/g _{s.tv.}]**	Ukupni proteini [mg/g _{s.tv.}]**	Antioksidacijska aktivnost	
							antioks. aktivnost (DPPH) [μM]**	antioks. aktivnost (FRAP) [μM]**
LUN 1	6	75	6,77 ± 0,01	4,34 ± 0,09	10,47 ± 0,28	86,2 ± 1,05	22,56 ± 0,78	120,74 ± 1,29

LUN 2	3	75	6,56 ± 0	3,99 ± 0,02	6,28 ± 0,24	73,98 ± 2,47	15,41 ± 0,71	89,67 ± 6,65
LUN 3	6	50	6,56 ± 0,01	4,1 ± 0,03	7,01 ± 0,24	69,08 ± 5,2	26,26 ± 0,96	74,17 ± 2,94
LUN 4	9	50	6,76 ± 0,01	4,48 ± 0	9,1 ± 0,07	81,15 ± 0,11	5,02 ± 0,43	133,26 ± 11,44
LUN 5	9	75	6,91 ± 0,01	4,53 ± 0	10,89 ± 0,66	79,48 ± 7,41	36,51 ± 2	139,73 ± 4,48
LUN 6	9	100	6,79 ± 0	4,16 ± 0,01	10,99 ± 1,21	95,14 ± 4,04	29,78 ± 4,67	143,63 ± 7
LUN 7	3	50	6,63 ± 0	4,52 ± 0,05	8,51 ± 0,83	76,36 ± 0,9	5,86 ± 0,87	74,56 ± 3,53
LUN 8	6	100	7,04 ± 0	4,21 ± 0	9,69 ± 1,32	95,04 ± 1,05	14,44 ± 3,91	144,91 ± 0,44
LUN 9	3	100	6,9 ± 0,01	4,83 ± 0,03	11,9 ± 0,14	102,39 ± 0,52	18,16 ± 2,09	151,29 ± 13,49

* rezultati izražen kao srednja vrijednost dvaju uzastopnih mjerenja

** rezultati izraženi kao srednja vrijednost dvaju paralela ± standardna devijacija; udio suhe tvari u uzorku je 94,5 %

t – vrijeme tretiranja uzorka, *A* – amplituda ultrazvuka, *G* – električna vodljivost uzorka

U Tablici 6 prikazani su rezultati izmjerenih fizikalno-kemijskih parametara, odnosno pH vrijednosti uzoraka, električne vodljivosti uzoraka, koncentracije ukupnih fenola i ukupnih proteina te antioksidacijske aktivnosti uzoraka, uz pripadajuće amplitude ultrazvuka i vrijeme tretiranja za svaki uzorak. Iz rezultata je vidljivo kako se pH uzoraka kreće od neutralnog do blago lužnatog područja tj. od $6,56 \pm 0,01$ do $7,04$. Električna vodljivost uzoraka obuhvaća vrijednosti od $3,99 \pm 0,02$ do $4,83 \pm 0,03$ mS/cm. Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktu izražena na g suhe tvari lista šećerne repe kreće se u rasponu od $6,28 \pm 0,24$ mg/g_{s.tv.} do $11,9 \pm 0,14$ mg/g_{s.tv.}, dok je raspon za koncentraciju ukupnih proteina od $69,08 \pm 5,2$ mg/g_{s.tv.} do $102,39 \pm 0,52$ mg/g_{s.tv.}. Vidljivo je da je koncentracija ukupnih fenola znatno manja u odnosu na koncentraciju ukupnih proteina. Razlog niske koncentracije fenolnih spojeva u ekstraktu može biti netopljivost fenola i njihovih kompleksa u otapalu (Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Nadalje, vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzoraka praćenu DPPH metodom znatno su niže (čak do 25 puta) u odnosu na antioksidacijsku aktivnost uzoraka praćenu FRAP metodom. Razlike u antioksidacijskoj aktivnosti spojeva prisutnih u suhom listu šećerne repe, koje su određene DPPH i FRAP metodama, mogu biti posljedica različitih vrsta antioksidansa prisutnih u uzorcima, koji reagiraju drugačije s korištenim radikalima (Shah i Modi, 2015). Uzorak LUN

9 ima najveću koncentraciju ukupnih fenola i proteina i najveću antioksidacijsku aktivnost uzoraka (mjerenu FRAP metodom), a tretiran je najkraće (3 min) s najvećom amplitudom ultrazvuka (100 %). S druge strane, uzorak LUN 2, tretiran također 3 min, ali nešto manjom amplitudom ultrazvuka (75 %) pokazuje najniže vrijednosti koncentracije ukupnih fenola.

4.1.3. Ukupna suha tvar u uzorku određena sušenjem lista šećerne repe do konstantne mase

Određivanje ukupne suhe tvari u uzorku sušenjem lista šećerne repe do konstantne mase odrađeno je prema prethodno opisanom postupku (poglavlje 3.2.7), a mjerenje je napravljeno u paraleli. Dobivena masa uzorka nakon sušenja izražena kao srednja vrijednost dvaju dobivenih vrijednosti iznosi $38,08 \pm 1,43$ g. Ukupna suha tvar izračunata je prema jednadžbi [5] (poglavlje 3.2.7) i izražena u postocima iznosi 94,5 %.

4.1.4. Usporedba rezultata dobivenih nakon toplinske ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta

Iz vrijednosti prikazanih u Tablicama 5 i 6 vidljivo je kako su srednje vrijednosti svih uzoraka za pH vrijednosti, električne vodljivosti i koncentracije ukupnih fenola približno jednake kod obje metode ekstrakcije. Općenito, temperatura ima pozitivan učinak na ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnih materijala. Uočeni pozitivni učinak temperature mogao bi se objasniti većom topljivošću fenola u otapalu, većom difuznošću ekstrahiranih molekula i poboljšanim prijenosom mase pri višim temperaturama (Galvan d'Alessandro i sur., 2012). Za parametre koncentracije ukupnih proteina i antioksidacijske aktivnosti uzoraka (DPPH) postignute su nešto veće vrijednosti ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom visokog intenziteta. Uzrok pozitivnog učinka ultrazvuka na koncentraciju ukupnih proteina može biti ta što sonicirana tkiva apsorbiraju dodatni volumen otapala (Galvan d'Alessandro i sur., 2012). Uslijed djelovanja ultrazvuka i pojave kavitacije, dolazi do bubrenja stanica (ali i njihovog pucanja), upijanja otapala i proširenja pora staničnih stijenki, što povećava njihovu difuznost. Poboljšani prinosi ekstrakcije proteina dobiveni uz pomoć ultrazvuka također se mogu pripisati

činjenici da ultrazvučno tretiranje uzorka može potaknuti pucanje staničnih stijenki i olakšati prijenos staničnog sadržaja (Galvan d'Alessandro i sur., 2012). Različita povećanja i smanjenja u prinosu proteina unutar ultrazvučno tretiranih uzoraka može se pripisati odabiru amplitude ultrazvuka. S povećanjem snage ultrazvuka, odnosno amplitude ultrazvuka dolazi do implozije kavitacijskih mjehurića u suspenziji pa je posljedično i veći prinos ekstrakcije proteina (Dukić i sur., 2022). Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzoraka (FRAP) su primjetno veće u slučaju kada je ekstrakcija provedena toplinom. Veća antioksidacijska aktivnost spojeva (FRAP) može biti posljedica prisutnosti antioksidansa u uzorku poput fosfata, slobodnih aminokiselina glicina i alanina, peptida niske molekulske mase (glutation), koji se oslobađaju iz biljnog matriksa povećanjem temperature, odnosno toplinskom obradom uzorka (Maikhunthod i Intarapichet, 2005). Također, više temperature ekstrakcije mijenjaju karakteristike otapala, povećavajući njegovu sposobnost otapanja (Maravić i sur., 2022).

U istraživanju koje su Dukić i sur. proveli 2022. na suhim i svježim uzorcima lista šećerne repe, ali uz ekstrakcijsko otapalo deioniziranu vodu (hladna i sobne temperature), kod uzoraka suhog lista šećerne repe dobivene su nešto više vrijednosti koncentracije ukupnih fenola, a koncentracija proteina je bila približno jednaka vrijednostima dobivenim u ovom istraživanju, koristeći ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom visokog intenziteta. S obzirom na to da su uspoređivani uzorci suhog i svježeg lišća šećerene repe podvrgnuti istim amplitudama ultrazvuka i vremenu tretiranja, može se govoriti o direktnom utjecaju otapala na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva. Odnosno, deionizirana voda se u ovom slučaju pokazala kao bolje ekstrakcijsko otapalo od 0,1 mM NaOH za fenolne spojeve. Za uzorke svježeg lista šećerne repe su postignute podjednake do nešto više vrijednosti koncentracije ukupnih fenola (Dukić i sur., 2022), a za većinu uzoraka svježeg lista postignute su i više vrijednosti koncentracije ukupnih proteina u tom istom istraživanju. Dakle, osim što ekstrakcijsko otapalo utječe na prinose ekstrakcije, pokazalo se i da sušenje kao metoda konzerviranja negativno utječe na proteine na način da im smanjuje stabilnost (Tamayo Tenorio i sur., 2017). Međutim, kada se usporede rezultati dobiveni za iste uzorke suhog lista šećerne repe, ali tretiranih toplinom, koncentracija ukupnih fenola u svježim uzorcima šećerne repe niža je u odnosu na uzorke suhog lista šećerne repe u ovom eksperimentu, dok su za suhe uzorke dobivene podjednake vrijednosti koncentracije ukupnih fenola. U slučaju koncentracije ukupnih proteina dobivene su veće vrijednosti kod uzoraka ekstrahiranih 0,1 mM NaOH, u odnosu na suhe i svježe uzorke kod kojih je korištena deionizirana voda kao ekstrakcijsko otapalo. Razlog tome može biti taj što su proteini u biljnim matriksima teško topljivi u vodi

zbog svoje hidrofobne prirode, ali i čvrstih kovalentnih veza u terciarnoj strukturi (npr. disulfidnih mostova), a prisutnost lužine pomaže raskinuti te veze (Shen i sur., 2008).

4.2. REZULTATI STATISTIČKE OBRADJE PODATAKA

4.2.1. Rezultati statističke obrade podataka za uzorke podvrgnute toplinskoj ekstrakciji

Tablica 7. Prikaz p-vrijednosti dobivenih ANOVA analizom za izlazne parametre toplinske ekstrakcije

IZLAZNI PARAMETAR	p-vrijednost*
pH	0,802861
G [mS/cm]	0,475508
Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva [mg/g_{s.tv.}]	0,026847
Koncentracija ukupnih proteina [mg/g_{s.tv.}]	0,002912
Antioks. Aktivnost spojeva (DPPH) [μM]	0,043462
Antioks. Aktivnost spojeva (FRAP) [μM]	0,000151

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

U Tablici 7 prikazane su p-vrijednosti za izlazne fizikalno-kemijske parametre toplinske ekstrakcije dobivene ANOVA statističkom analizom. Detaljan prikaz ANOVA analize nalazi se u priložima 1-6.

U prilogu 1 prikazana je ANOVA analiza za pH vrijednosti ekstrakata mjenjenih nakon toplinske ekstrakcije. Iz navedene ANOVE proizlazi da je p-vrijednost između skupina veća od 0,05 pa stoga nema statistički značaj, odnosno vrijeme tretiranja nema statistički značajan utjecaj na pH vrijednosti ekstrakata. ANOVA analiza za vrijednosti električne vodljivosti u prilogu 2 pokazuje p-vrijednosti veće od 0,05 te ni ona također, kao ni pH vrijednosti uzoraka, nema statistički značaj, odnosno vrijeme tretiranja statistički značajno ne utječe na vrijednosti

električne vodljivosti uzoraka.

ANOVA analiza za vrijednosti koncentraciju ukupnih fenola prikazana u prilogu 3 pokazuje p-vrijednosti manje od 0,05, što znači da vrijeme tretiranja ima statistički značajan utjecaj na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva dobivenih u ekstraktu na razini pouzdanosti od 95,0 % ($p < 0,05$).

Iz ANOVA analize u prilogu 4 vidljivo je da je p-vrijednost za koncentraciju ukupnih proteina u ekstraktima manja od 0,05. Dakle, kao i kod koncentracije ukupnih fenola, vidljiva je statistička značajnost vremena tretiranja na izlazne vrijednosti koncentracije ukupnih proteina. U usporedbi s koncentracijom ukupnih fenola, vidljivo je da vrijeme tretiranja toplinom ima značajniji utjecaj na koncentraciju ukupnih proteina, nego na koncentraciju ukupnih fenola.

ANOVA analiza u prilogu 5 pokazuje p-vrijednosti manje 0,05, što ukazuje na to da vrijeme tretiranja toplinom ima statistički značajan utjecaj također i na antioksidacijsku aktivnost uzoraka mjerenu DPPH metodom. U usporedbi s prethodna dva parametra (koncentracija ukupnih fenola i proteina u prilogu 3 i 4), vrijeme tretiranja toplinom ima statistički najmanje značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost uzoraka praćenu DPPH metodom.

Kod ANOVA analize provedene za antioksidacijsku aktivnost uzoraka praćenu FRAP metodom (prilog 6) također su dobivene p-vrijednosti manje od 0,05, što znači da vrijeme tretiranja ima statistički značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost uzoraka u toplinskim ekstraktima praćenu FRAP metodom. Vidljivo je i da vrijeme tretiranja toplinom ima dosta značajniji utjecaj na antioksidacijsku aktivnost uzoraka praćenu FRAP metodom, nego što je to slučaj kod antioksidacijske aktivnosti uzoraka praćene DPPH metodom.

4.2.2. Rezultati statističke obrade podataka fizikalno-kemijskih parametara uzoraka podvrgnutih ekstrakciji ultrazvukom visokog intenziteta

Tablica 8. Prikaz p-vrijednosti dobivenih MANOVA analizom za izlazne parametre ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta

	IZLAZNI PARAMETRI	GLAVNI UTJECAJ		INTERAKCIJE		
		A*	B*	AA*	AB*	BB*
	pH	0,1368	0,4162	0,7688	0,5115	0,7915

p- vrijednost	G [mS/cm]	0,9148	0,8582	0,7169	0,4342	0,4735
	Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva [mg/g_{s.tv.}]	0,2242	0,4700	0,8455	0,7480	0,7378
	Koncentracija ukupnih proteina [mg/g_{s.tv.}]	0,0299	0,8687	0,2671	0,4476	0,8060
	Antioks. Aktivnost spojeva (DPPH) [μM]	0,9307	0,9060	0,2511	0,5830	0,4817
	Antioks. Aktivnost spojeva (FRAP) [μM]	0,0228	0,0696	0,7558	0,1123	0,4672

*A – amplituda ultrazvuka, B – vrijeme tretiranja, AA – kvadratna interakcija amplitude, AB – međusobna interakcija amplitude i vremena tretiranja, BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja

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

U Tablici 8 nalaze se p-vrijednosti dobivenih MANOVA analizom izlaznih fizikalno-kemijskih parametara ekstrakcije proteina i fenolnih spojeva te antioksidacijske aktivnosti u suhom listu šećerne repe dobivenih nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta. Detaljniji prikaz MANOVA analize nalazi se u prilogima 7-12.

Analiza varijanci dijeli varijabilnost pH, električne vodljivosti, koncentracije ukupnih fenolnih spojeva, koncentracije ukupnih proteina te antioksidacijske aktivnosti uzoraka praćen DPPH i FRAP metodom za svaki od učinaka. Da bi se provjerila statistička značajnost svakog od utjecaja na ispitivane parametre, srednja vrijednost kvadrata uspoređuje se s procjenom eksperimentalne pogreške. Statistička analiza koristi F-omjer kako bi utvrdila je li varijabilnost između skupina veća od varijabilnosti unutar skupina. F-omjer se također koristi i kako bi se utvrdila sveukupna važnost modela i koeficijenta determinacije R^2 .

U prilogu 7 prikazana je analiza varijanci za pH vrijednosti ekstrakata dobivenih nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta. Analizom varijanci testirana su dva učinka: A i B te njihove interakcije AA, AB i BB. Iz procjene eksperimentalne pogreške, odnosno p – vrijednosti, vidljivo je da niti jedan od praćenih učinaka (vrijeme tretiranja i amplituda) nemaju statistički značajan utjecaj na izlazne vrijednosti pH, s obzirom da niti jedna vrijednost nije manja od 0,05, na razini pouzdanosti od 95,0 %.

Također, očitanjem Pareto dijagrama (prilog 13) vidljivo je da praćeni učinci nemaju statistički značajan utjecaj. U prilogu 19 nalazi se i dijagram odzivne površine za izlazne vrijednosti pH.

Jednadžba regresije za pH vrijednosti (prilog 25) opisuje ponašanje polinoma dobivenog iz obrađenih rezultata, ovisno o vrijednostima amplitude ultrazvuka i vremena tretiranja. Nadalje, optimalna pH vrijednost za dane uzorke iznosi 6,93, a prema rezultatima optimizacije ta vrijednost postigla bi se pri amplitudi 100 % i vremenu tretiranja 6,09 min (prilog 31). Iako te ulazne vrijednosti nisu pokazale statistički značajan utjecaj na izlaznu vrijednost pH, ipak imaju određeni utjecaj na nju.

Iz p-vrijednosti u prilogu 8 vidljivo je da na električnu vodljivost, kao ni na pH vrijednosti, ne utječu ulazni parametri ni njihove interakcije, tj. kvadratne interakcije amplitude i vremena tretiranja te međusobne interakcije amplitude i vremena tretiranja ($p > 0,05$).

Iz Pareto dijagrama (prilog 14) može se također iščitati da amplituda ultrazvuka i vrijeme tretiranja nemaju statistički značajan utjecaj na izlazne parametre električne vodljivosti. U prilogu 20 nalazi se dijagram odzivne površine za električnu vodljivost. Jednadžba regresije za električnu vodljivost (prilog 26) opisuje ponašanje polinoma dobivenog iz obrađenih rezultata, ovisno o vrijednostima amplitude i vremena tretiranja. Optimizacijom parametara (prilog 32) utvrđeno je da je optimalna vrijednost električne vodljivosti 4,65 mS/cm. Ta vrijednost postiže se uz amplitudu ultrazvuka 100 % i vrijeme tretiranja 3 min. Iako te ulazne vrijednosti nisu pokazale statistički značajan utjecaj na izlaznu vrijednost električne vodljivosti, ipak imaju određeni utjecaj na nju.

Iz p-vrijednosti navedenih u prilogu 9 može se iščitati da ni na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva također ne utječu ni vrijeme tretiranja ni amplituda ultrazvuka kojom su tretirani uzorci suhog lista šećerne repe, a ni njihove kvadratne interakcije, kao ni njihove međusobne interakcije jer su sve p – vrijednosti veće od 0,05. Iz Pareto dijagrama (prilog 15) može se također vidjeti da amplituda i vrijeme tretiranja nemaju statistički značajan utjecaj na izlazne parametre. U prilogu 21 nalazi se dijagram odzivne površine za koncentraciju ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima, a u prilogu 27 prikazana je jednadžba regresije za koncentraciju ukupnih fenola koja opisuje ponašanje polinoma dobivenog iz obrađenih rezultata, ovisno o vrijednostima amplitude ultrazvuka i vremena tretiranja. Optimalna vrijednost koncentracije ukupnih fenola u uzorcima iznosi 11,38 mg/g_{s.tv}, a optimalna vrijednost amplitude ultrazvuka kojom bi se to postiglo iznosi 100 %, dok optimalno vrijeme tretiranja iznosi 9 min (prilog 33). Iako te ulazne vrijednosti nisu pokazale statistički značajan utjecaj na izlaznu vrijednost koncentracije ukupnih fenola, ipak imaju određeni utjecaj na nju.

Prema prilogu 10 vidljivo je da ulazni parametar amplitude ima utjecaj na izlazni parametar koncentracije ukupnih proteina. Budući da rezultati pokazuju $p < 0,05$ za utjecaj amplitude ultrazvuka, može se zaključiti da amplituda ima statistički značajan utjecaj na

koncentraciju ukupnih proteina, dok kvadratna interakcija amplitude, vremena tretiranja, vrijeme tretiranja i međusobna interakcija vremena tretiranja i amplitude nemaju statistički značajan utjecaj ($p > 0,05$). Pareto dijagram (prilog 16) prikazuje isti rezultat, odnosno da povećanjem amplitude raste i koncentracija proteina. U prilogu 22 prikazan je dijagram odzivne površine za koncentraciju ukupnih proteina, dok se u prilogu 28 nalazi jednadžba regresije za koncentraciju ukupnih proteina koja opisuje ponašanje polinoma dobivenog iz obrađenih rezultata, ovisno o vrijednostima amplitude ultrazvuka i vremena tretiranja uzoraka. Optimalna vrijednost za koncentraciju ukupnih proteina analiziranih uzoraka prema MANOVA analizi varijance iznosi 100,463 mg/g_{s.tv.}, a ta vrijednost se može postići optimalnom vrijednosti amplitude ultrazvuka koja iznosi 100 % i optimalnim vremenom tretiranja uzoraka koje iznosi 3 min (prilog 34). Ovdje treba uzeti u obzir i to da se amplituda pokazala kao ulazni parametar koji ima statistički značajan utjecaj na izlazni parametar koncentracije ukupnih proteina.

Iz rezultata prikazanih u prilogu 11 vidljivo je da na antioksidacijsku aktivnost uzoraka koja je mjerena DPPH metodom ne utječu praćeni utjecaji amplitude ultrazvuka i vremena tretiranja, kao ni kvadratna interakcija amplitude, vremena tretiranja te međusobna interakcija tih dvaju utjecaja, budući da su njihove p-vrijednosti znatno veće od 0,05. U Pareto dijagramu (prilog 17) je također vidljivo da niti za jedan praćeni parametar nije postignut statistički značajan utjecaj ulaznih parametara. U prilogu 23 prikazan je dijagram odzivne površine za antioksidacijsku aktivnost uzoraka praćenu DPPH metodom, a u prilogu 29 jednadžba regresije za isti parametar koja opisuje ponašanje polinoma dobivenog iz obrađenih rezultata, ovisno o vrijednostima amplitude i vremena tretiranja. Optimalna vrijednost za antioksidacijsku aktivnost uzoraka mjerenu DPPH metodom analiziranih uzoraka prema MANOVA analizi varijance iznosi 29,7 μ M, a ta vrijednost se može postići optimalnom vrijednosti amplitude koja iznosi 74,32 % i optimalnim vremenom tretiranja koje iznosi 6,16 min (prilog 35). Iako te ulazne vrijednosti nisu pokazale statistički značajan utjecaj na izlaznu vrijednost antioksidacijske aktivnosti uzoraka koja je praćena DPPH metodom, ipak imaju određeni utjecaj na nju.

Iz dobivenih rezultata (prilog 12) vidljivo je da ulazna vrijednost amplitude ultrazvuka ima utjecaj na izlaznu vrijednost antioksidacijske aktivnosti uzoraka praćene FRAP metodom. Naime, amplituda ultrazvuka pokazuje p-vrijednost manju od 0,05, što znači da ona ima statistički značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost uzoraka koja je mjerena FRAP metodom. Vrijeme tretiranja uzoraka ima nešto veću p-vrijednost od 0,05, no s obzirom da je ipak veća, ne može se smatrati statistički značajnom. Kvadratna interakcija amplitude ultrazvuka i vremena tretiranja uzoraka, kao i međusobna interakcija amplitude i vremena

tretiranja također ne pokazuju statistički značajan utjecaj. Sve navedeno moguće je vidjeti i u grafičkom prikazu u Pareto dijagramu (prilog 18). U prilogu 24 prikazan je dijagram odzivne površine za antioksidacijsku aktivnost praćenu FRAP metodom, a u prilogu 30 jednadžba regresije za isti parametar koja opisuje ponašanje polinoma dobivenog iz obrađenih rezultata, ovisno o vrijednostima amplitude i vremena tretiranja. Optimalna vrijednost za antioksidacijsku aktivnost uzoraka mjerenu FRAP metodom analiziranih uzoraka prema MANOVA analizi varijance iznosi 149,78 μM , a ta vrijednost se može postići optimalnom vrijednosti amplitude ultrazvuka koja iznosi 100 % i optimalnim vremenom tretiranja koje iznosi 9 min (prilog 36). Ovdje je također važno naglasiti i to da se amplituda ultrazvuka pokazala kao ulazni parametar koji ima statistički značajan utjecaj na izlazni parametar antioksidacijske aktivnosti uzoraka mjerene FRAP metodom.

Nakon provedene statističke obrade rezultata, kod ekstrakata dobivenih toplinskom ekstrakcijom uočava se statistički značajan utjecaj vremena tretiranja na sve praćene parametre osim pH vrijednosti i električne vodljivosti, dok kod ekstrakata dobivenih ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom visokog intenziteta to nije slučaj. Naime, tu je uočeno da jedino amplituda ultrazvuka ima statistički značajan utjecaj i to na koncentraciju ukupnih proteina i antioksidacijsku aktivnost uzoraka praćenu FRAP metodom. Također je vidljivo i da je optimalna amplituda ultrazvuka za sve praćene parametre (osim antioksidacijske aktivnosti (DPPH)) 100 %.

5. ZAKLJUČCI

1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta daje veće prinose ukupnih proteina i veću antioksidacijsku aktivnost spojeva praćenu DPPH metodom, u odnosu na toplinsku ekstrakciju. Najveća vrijednost koncentracije ukupnih proteina kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta iznosi $102,39 \pm 0,52$ mg/g_{s.tv} (uz vrijeme tretiranja 3 min i amplitudu ultrazvuka 100 %), dok najveća antioksidacijska aktivnost spojeva (DPPH) iznosi $36,51 \pm 2$ μ M (uz vrijeme tretiranja 9 min i amplitudu ultrazvuka 75 %).
2. Vrijednosti dobivene za pH vrijednosti uzoraka, električnu vodljivost uzoraka i koncentraciju ukupnih fenola toplinskom ekstrakcijom i ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom visokog intenziteta su podjednake, odnosno nema većih odstupanja između vrijednosti dobivenih pomoću ove dvije metode ekstrakcije.
3. Više vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzoraka praćene FRAP metodom uočene su u toplinski tretiranim uzorcima. Konkretno, najveća vrijednost antioksidacijske aktivnosti spojeva nakon toplinske ekstrakcije iznosi $158,22 \pm 6,15$ μ M (uz vrijeme tretiranja 6 min), a nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta iznosi $89,67 \pm 6,65$ μ M (vrijeme tretiranja 6 min i amplituda ultrazvuka 50 %).
4. Statistička obrada podataka ultrazvučno tretiranih uzoraka pokazala je kako statistički značajan utjecaj na prinos ukupnih proteina i na antioksidacijsku aktivnost spojeva praćenu FRAP metodom ima primijenjena amplituda ultrazvuka ($p < 0,05$).
5. Statističkom obradom podataka utvrđeno je da pri toplinskoj ekstrakciji na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva i ukupnih proteina te antioksidacijsku aktivnost spojeva (DPPH i FRAP metode) statistički značajan utjecaj ima vrijeme tretiranja uzoraka toplinom ($p < 0,05$).
6. Suhi list šećerne repe predstavlja dobar izvor proteina i pokazuje veliki potencijal za iskorištenje kao alternativni izvor proteina u prehrani, a uz to se dobro uklapa i u koncept održivog razvoja.
7. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta dobra je alternativa za

konvencionalne metode ekstrakcije pomoću koje je moguće dobiti dobre prinose funkcionalnih sastojaka iz otpada prehrambene industrije, a uz minimalan utjecaj na okoliš.

6. LITERATURA

Agroklub (2023) Šećerna repa, <https://www.agroklub.com/sortna-lista/repa-krumpir/secerna-repa-35/>. Pristupljeno 8. kolovoza 2023.

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. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.127673>

Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI (2021) Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr. Res. Food Sci.*, 4. 200-214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>

Anonymous 1. (2023) <http://www.mpc-miholjac.hr/2022/05/otvoreno-podnosenje-zahtjeva-za-potpore-iz-programa-potpore-za-proizvodace-secerne-repe-za-2022-godinu/>. Pristupljeno 8. kolovoza 2023.

Bass S, Dalal-Clayton B (2002) *Sustainable Development Strategies*, Routledge. London, str. 5.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Techn.*, **28**, 1, 25-30.

Chavan P, Sharma P, Sharma SR, Mittal TC, Jaiswal AK (2022) Application of High-Intensity Ultrasound to Improve Food Processing Efficiency: A Review. *Foods.*, **11**, 1, 122. <https://doi.org/10.3390/foods11010122>

Cheyrier V (2012) Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochem. Rev.*, **11**, 153–177. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8>

Di Stefano E, Agyei D, Njoku EN, Udenigwe CC (2018) Plant RuBisCo: An Underutilized Protein for Food Applications. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **95**, 8, 1063–1074. doi:10.1002/aocs.12104

Dohm J, Minoche A, Holtgräwe D (2014) The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*). *Nature.*, **505**, 546–549. <https://doi.org/10.1038/nature12817>

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*). *Appl. Sci.*, **12**, 8949. <https://doi.org/10.3390/app12188949>

Sedem Dzah C, Duan Y, Zhang H, Wen C, Zhang J, Chen G i sur. (2020) The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Biosci*, **35**, 10054. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>

Ebrahimi P, Mihaylova D, Lante A (2022) Comparison of green technologies for valorizing sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Food Sci. Biotechnol.*, **5**(2), 119-130. <https://doi.org/10.30721/fsab2022.v5.i2>

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

FAO (2011) Food loss and waste. FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, <https://www.fao.org/nutrition/capacity-development/food-loss-and-waste/en/>.
Pristupljeno 27. kolovoza 2023.

Gadioli Tarone A, Keven Silva E, Dias de Freitas Queiroz Barros H, Baú Betim Cazarin C, Marostica Junior MR (2021) High-intensity ultrasound-assisted recovery of anthocyanins from jaboticaba by-products using green solvents: Effects of ultrasound intensity and solvent composition on the extraction of phenolic compounds. *Food Res. Int.*, **140**, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110048>

Galvan d'Alessandro L, Kriaa K, Nikov I, Dimitrov K (2012) Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Sep. Purif. Technol.*, **93**, 42-47. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.03.024>

Goktakyoglu E, Oztop MH, Ozcan S (2023) Proteomics Approach to Differentiate Protein Extraction Methods in Sugar Beet Leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 71, 9157-9163. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c09190>

Gracio M, Oliveira S, Lima A, Boavida Ferreira R (2023) RuBisCO as a protein source for potential food applications: A review. *Food Chem.*, 419. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135993>

Halliwel B, Aeschbach R, Löliger J, Aruoma OI (1995) The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, **33**, 7, 601–617. doi:10.1016/0278-6915(95)00024-v

Halliwel B (1996) Antioxidants: The Basics-what they are and how to Evaluate them. *Advances in Pharmacology*, 3–20. doi:10.1016/s1054-3589(08)60976-x

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=52482>. Pristupljeno 8. 8. 2023.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=7975>. Pristupljeno 10. 8. 2023.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=17468>. Pristupljeno 11. 8. 2023.

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**, 44, 8305–8314. doi:10.1021/acs.jafc.6b03095

Kiskini A (2017) Sugar beet leaves: from biorefinery to techno-functionality

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>

Li H, Pordesimo L, Weiss J (2004) High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Res. Int.*, **37**, 7, 731–738. doi:10.1016/j.foodres.2004.02.016

Mahesha HB (2012) Estimation of Proteins by Lowry's Method

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. *Sustain. Chem. Pharm.*, 28, <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100728>

Matthews A (2020) The new CAP must be linked more closely to the UN Sustainable Development Goals. *Agric. Food Econ.*, **8**, 19. <https://doi.org/10.1186/s40100-020-00163-3>

Maikhunthod B, Intarapichet KO (2005) Heat and ultrafiltration extraction of broiler meat carnosine and its antioxidant activity. *Meat. Sci.*, 71, 364-374. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.04.017>

Ough CS, Amerine MA (1988) *Methods Analysis of Musts and Wines*. John Wiley and Sons, New York.

Paniwnyk L, Alarcon – Rojo A, Rodriguez-Figueroa JC, Toma M (2017) The Use of Ultrasound as an Enhancement Aid to Food Extraction. U: Grumezescu AM, Holban AM (ured.) *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food*, Academic Press, Cambridge, str. 399–440.

Picot-Allain C, Fawzi Mahomoodally M, Ak G, Zengin G (2021) Conventional versus green extraction techniques — a comparative perspective. *Curr. Opin. Food Sci.*, **40**, 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.009>

Rajaeifar MA, Sadeghzadeh Hemayati S, Tabatabaei M, Aghbashlo M, Mahmoudi SB (2019) A review on beet sugar industry with a focus on implementation of waste-to-energy strategy for power supply. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 103, 423–442. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2018.12.056>.

Rasul MG (2018) Conventional extraction methods use in medicinal plants, their advantages and disadvantages. *Int. J. Basic Sci. Appl. Comput*, **2**, 10-14.

Režek Jambrak A, Herceg Z, Šubarić D, Babić J, Brnčić M, Rimac Brnčić S, Bosiljkov T, Čvek D, Tripalo B, Gelo J (2010) Ultrasound effect on physical properties of corn starch. *Carbohydr. Polym.*, **79**, 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.051>

Shah P, Modi HA (2015) Comparative Study of DPPH, ABTS and FRAP Assays for Determination of Antioxidant Activity. *Int. J. Res. Appl. Sci. Eng. Technol* , **3**, 6, 636-641.

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>

Shen L, Wang X, Wang Z, Wu Y, Chen J (2008) Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food Chem.*, **107**, 929–938. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.047>

Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagent. *Am. J. Enol. Viticult.*, **16**, 144-158.

Subrahmanyeswari T, Gantait S (2022) Advancements and prospectives of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **106**, 7417–7430. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12226-0>

Tamayo Tenorio A (2017) Sugar Beet Leaves for Functional Ingredients. Wageningen University and Research

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>

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>

Toma M, Vinatoru M, Paniwnyk L, Mason T (2001) Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonic. Sonochem.*, **8**, 2, 137–142. doi:10.1016/s1350-4177(00)00033-x

Vertuani S, Angusti A, Manfredini S (2004) The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*, **10**, 14, 1677–1694. doi:10.2174/1381612043384655

Xu CC, Wang B, Pu YQ, Tao JS, Zhang T (2017) Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chin. J. Nat. Med.*, **15**, 10, 721–731. doi:10.1016/s1875-5364(17)30103-6

Yazdankhah S, Hojjati M, Azizi M (2019) Extraction of Phenolic Compounds from Black Mulberry Using Aqueous, Ethanol and Aqueous-Ethanol Solvents: Effects of Heat Treatments on Chemical Properties of the Extracts. *Nutr. Food Sci. Res.*, **6**, 39-47. 10.29252/nfsr.6.3.39.

7. PRILOZI

Prilog 1. Analiza varijanci (ANOVA) za pH vrijednosti uzoraka podvrgnutih toplinskoj ekstrakciji

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*	f (kritično)
Između skupina**	0,320166	1	0,320166	0,071147	0,802861	7,708647
Unutar skupina**	18,00034	4	4,500085	/	/	/
Ukupno	18,3205	5	/	/	/	/

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

**skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); vrijednosti pH uzoraka (Tablica 5)

Prilog 2. Analiza varijanci (ANOVA) za vrijednosti električne vodljivosti uzoraka podvrgnutih toplinskoj ekstrakciji

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*	f (kritično)
Između skupina**	2,909281	1	2,909281	0,618722	0,475508	7,708647
Unutar skupina**	18,65288	4	4,702081	/	/	/
Ukupno	21,7176	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 uzoraka [mS/cm] (Tablica 5)

Prilog 3. Analiza varijanci (ANOVA) za vrijednosti koncentracije ukupnih fenolnih spojeva uzoraka podvrgnutih toplinskoj ekstrakciji

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*	f (kritično)
Između skupina**	65,46976	1	65,46976	11,67779	0,026847	7,708647

Unutar skupina**	22,4254	4	5,606349	/	/	/
Ukupno	87,89515	5	/	/	/	/

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

**skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); vrijednosti koncentracije ukupnih fenolnih spojeva [mg/g_{s.tv.}] (Tablica 5)

Prilog 4. Analiza varijanci (ANOVA) za vrijednosti koncentracije ukupnih proteina uzoraka podvrgnutih toplinskoj ekstrakciji

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*	f (kritično)
Između skupina**	7865,285	1	7865,285	42,08074	0,002912	7,708647
Unutar skupina**	747,6375	4	186,9094	/	/	/
Ukupno	8612,923	5	/	/	/	/

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

**skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); vrijednosti koncentracije ukupnih proteina [mg/g_{s.tv.}] (Tablica 5)

Prilog 5. Analiza varijanci (ANOVA) za vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzoraka (DPPH) podvrgnutih toplinskoj ekstrakciji

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*	f (kritično)
Između skupina**	162,4763	1	162,4763	8,49704	0,043462	7,708647
Unutar skupina**	76,48609	4	19,12152	/	/	/
Ukupno	238,9624	5	/	/	/	/

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

**skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); vrijednosti antioksidacijske aktivnosti spojeva (DPPH) [μM] (Tablica 5)

Prilog 6. Analiza varijanci (ANOVA) za vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzoraka (FRAP) podvrgnutih toplinskoj ekstrakciji

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost*	f (kritično)
Između skupina**	29950,07	1	29950,07	195,7603	0,000151	7,708647
Unutar skupina**	611,9741	4	152,9935	/	/	/
Ukupno	30562,04	5	/	/	/	/

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

**skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); vrijednosti antioksidacijske aktivnosti spojeva (FRAP) [μM] (Tablica 5)

Prilog 7. Analiza varijanci (MANOVA) za pH vrijednosti ekstrakata uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta

Izvor	Zbroj kvadrata	Df – stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F - omjer	p – vrijednost **
A	0,10114	1	0,10114	4,08	0,1368
B	0,0219615	1	0,0219615	0,89	0,4162
AA	0,00256806	1	0,00256806	0,10	0,7688
AB	0,013689	1	0,013689	0,55	0,5115
BB	0,00206939	1	0,00206939	0,08	0,7915
Ukupna pogreška	0,0744321	3	0,0248107		
Ukupna korekcija	0,21586	8			

*A – amplituda ultrazvuka, B – vrijeme tretiranja uzoraka, AA – kvadratna interakcija amplitude, AB – međusobna interakcija amplitude i vremena tretiranja, BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja

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

***skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); amplituda ultrazvuka (50, 75 i 100 %); pH vrijednosti (Tablica 6)

$R^2 = 65,5184 \%$

R^2 (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 8,049 %

Standardna pogreška procjene = 0,157514

Srednja apsolutna pogreška = 0,0751358

Durbin-Watson statistika = 2,00223 (P=0,0923)

Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,00124701

Prilog 8. Analiza varijanci (MANOVA) za vrijednosti električne vodljivosti uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta

Izvor	Zbroj kvadrata	Df – stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F - omjer	p – vrijednost **
A	0,00160067	1	0,00160067	0,01	0,9148
B	0,00448267	1	0,00448267	0,04	0,8582

AA	0,018818	1	0,018818	0,16	0,7169
AB	0,0961	1	0,0961	0,81	0,4342
BB	0,079202	1	0,079202	0,67	0,4735
Ukupna pogreška	0,355513	3	0,118504		
Ukupna korekcija	0,555716	8			

*A – amplituda ultrazvuka, B – vrijeme tretiranja uzoraka, AA – kvadratna interakcija amplitude, AB – međusobna interakcija amplitude i vremena tretiranja, BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja

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

***skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); amplituda ultrazvuka (50, 75 i 100 %); vrijednosti električne vodljivosti (Tablica 6)

$R^2 = 36,0262 \%$

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

Standardna pogreška procjene = 0,344244

Srednja apsolutna pogreška = 0,175556

Durbin-Watson statistika = 2,3862 (P=0,3932)

Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,28841

Prilog 9. Analiza varijanci (MANOVA) za vrijednosti koncentracije ukupnih fenolnih spojeva uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta

Izvor	Zbroj kvadrata	Df – stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F - omjer	p – vrijednost **
A	10,5343	1	10,5343	2,33	0,2242
B	3,07319	1	3,07319	0,68	0,4700
AA	0,203509	1	0,203509	0,05	0,8455
AB	0,560098	1	0,560098	0,12	0,7480
BB	0,609624	1	0,609624	0,13	0,7378
Ukupna pogreška	13,5538	3	4,51794		
Ukupna korekcija	28,5345	8			

*A – amplituda ultrazvuka, B – vrijeme tretiranja uzoraka, AA – kvadratna interakcija amplitude, AB – međusobna interakcija amplitude i vremena tretiranja, BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja

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

***skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); amplituda ultrazvuka (50, 75 i 100 %); vrijednosti ukupnih fenolnih spojeva (Tablica 6)

$R^2 = 52,5003 \%$

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

Standardna pogreška procjene = 2,12554

Srednja apsolutna pogreška = 1,06875

Durbin-Watson statistika = 2,38066 (P=0,3873)

Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,34085

Prilog 10. Analiza varijanci (MANOVA) za vrijednosti koncentracije ukupnih proteina uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta

Izvor	Zbroj kvadrata	Df – stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F - omjer	p – vrijednost **
A	725,688	1	725,688	15,21	0,0299
B	1,54295	1	1,54295	0,03	0,8687
AA	88,2035	1	88,2035	1,85	0,2671
AB	36,2302	1	36,2302	0,76	0,4476
BB	3,43043	1	3,43043	0,07	0,8060
Ukupna pogreška	143,116	3	47,7053		
Ukupna korekcija	998,211	8			

*A – amplituda ultrazvuka, B – vrijeme tretiranja uzoraka, AA – kvadratna interakcija amplitude, AB – međusobna interakcija amplitude i vremena tretiranja, BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja

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

***skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); amplituda ultrazvuka (50, 75 i 100 %); vrijednosti ukupnih proteina (Tablica 6)

$R^2 = 85,6628 \%$

R^2 (prilagođeno za stupnjeve slobode) = 61,7674 %

Standardna pogreška procjene = 6,9069

Srednja apsolutna pogreška = 3,2646

Durbin-Watson statistika = 2,04869 (P=0,1151)

Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,217844

Prilog 11. Analiza varijanci (MANOVA) za vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzoraka (DPPH) podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta

Izvor	Zbroj kvadrata	Df – stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F - omjer	p – vrijednost **
A	1,47178	1	1,47178	0,01	0,9307
B	2,71197	1	2,71197	0,02	0,9060
AA	331,671	1	331,671	2,01	0,2511
AB	61,9991	1	61,9991	0,38	0,5830
BB	105,729	1	105,729	0,64	0,4817
Ukupna pogreška	494,426	3	164,809		
Ukupna korekcija	998,007	8			

*A – amplituda ultrazvuka, B – vrijeme tretiranja uzoraka, AA – kvadratna interakcija amplitude, AB – interakcija amplitude i vremena tretiranja, BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja

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

***skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); amplituda ultrazvuka (50, 75 i 100 %); vrijednosti antioksidacijske aktivnosti spojeva (DPPH) (Tablica 6)

$R^2 = 50,4587 \%$

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

Standardna pogreška procjene = 12,8378

Srednja apsolutna pogreška = 6,38322

Durbin-Watson statistika = 3,00234 (P=0,9426)

Lag 1 rezidualna autokorelacija = -0,58714

Prilog 12. Analiza varijanci (MANOVA) za vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzoraka (FRAP) podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta

Izvor	Zbroj kvadrata	Df – stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F - omjer	p – vrijednost **
A	4151,75	1	4151,75	18,70	0,0228

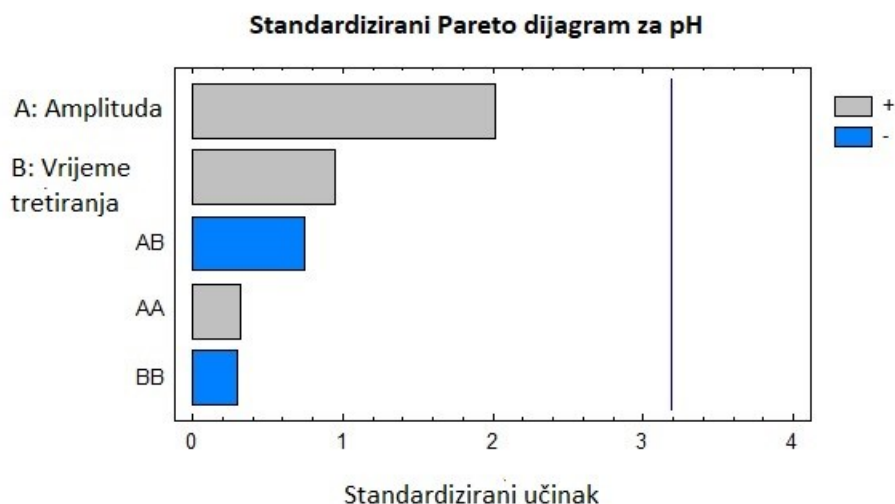
B	1703,33	1	1703,33	7,67	0,0696
AA	25,7738	1	25,7738	0,12	0,7558
AB	1101,03	1	1101,03	4,96	0,1123
BB	153,06	1	153,06	0,69	0,4672
Ukupna pogreška	665,907	3	221,969		
Ukupna korekcija	7800,85	8			

*A – amplituda ultrazvuka, B – vrijeme tretiranja uzoraka, AA – kvadratna interakcija amplitude, AB – međusobna interakcija amplitude i vremena tretiranja, BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja

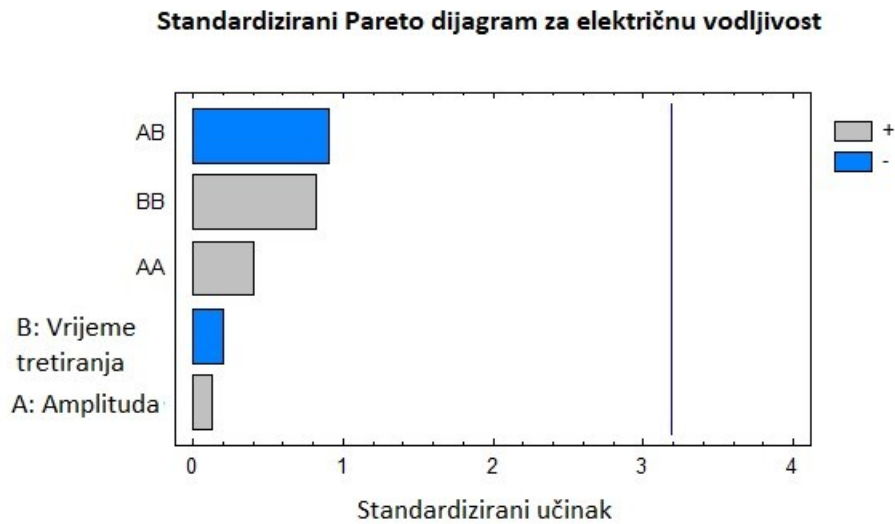
**utjecaj parametra je statistički značajan ako je $p < 0,05$; statistički značajna vrijednost označena je crvenom bojom

***skupine korištene za analizu varijance: vrijeme tretiranja (3, 6 i 9 min); amplituda ultrazvuka (50, 75 i 100 %); vrijednosti antioksidacijske aktivnosti spojeva (FRAP) (Tablica 6)

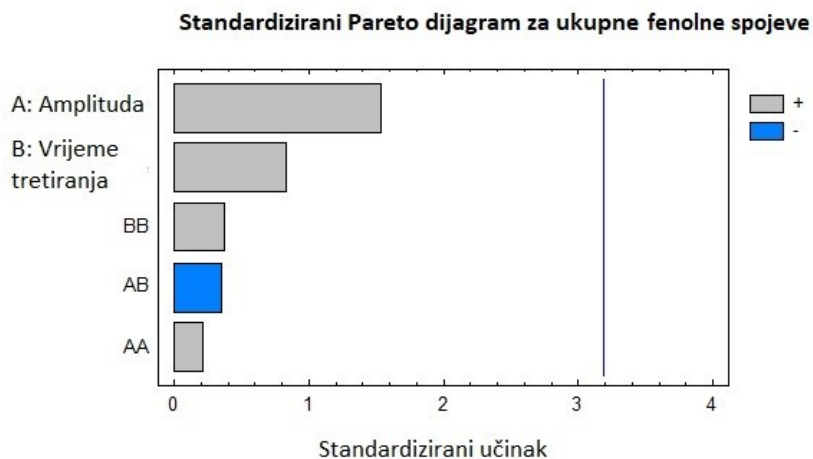
Prilog 13. Pareto dijagram tj. grafički prikaz utjecaja ulaznih vrijednosti amplitude ultrazvuka i vremena tretiranja na izlaznu vrijednost pH uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta; AA – kvadratna interakcija amplitude ultrazvuka, BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja uzoraka, AB – međusobna interakcija amplitude i vremena tretiranja



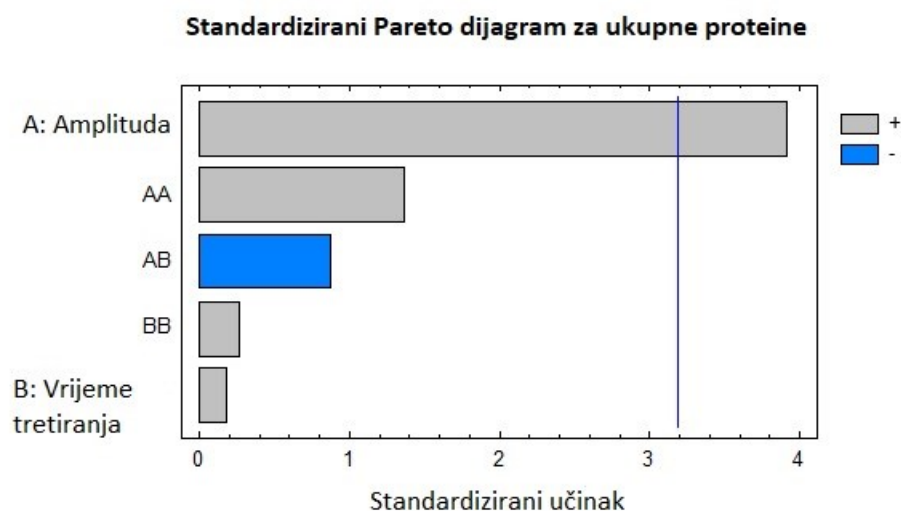
Prilog 14. Pareto dijagram tj. grafički prikaz utjecaja ulaznih vrijednosti amplitude ultrazvuka i vremena tretiranja na izlaznu vrijednost električnu vodljivost uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta; AA – kvadratna interakcija amplitude ultrazvuka, BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja uzoraka, AB – međusobna interakcija amplitude i vremena tretiranja



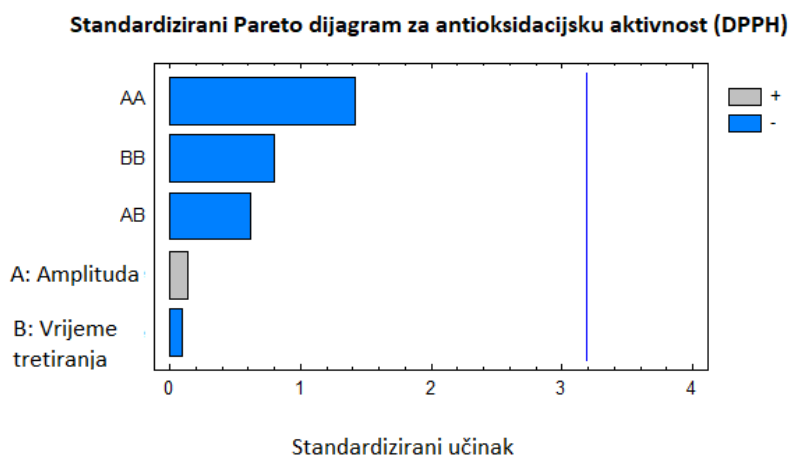
Prilog 15. Pareto dijagram tj. grafički prikaz utjecaja ulaznih vrijednosti amplitude ultrazvuka i vremena tretiranja na izlaznu vrijednost koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta; AA – kvadratna interakcija amplitude ultrazvuka, BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja uzoraka, AB – međusobna interakcija amplitude i vremena tretiranja



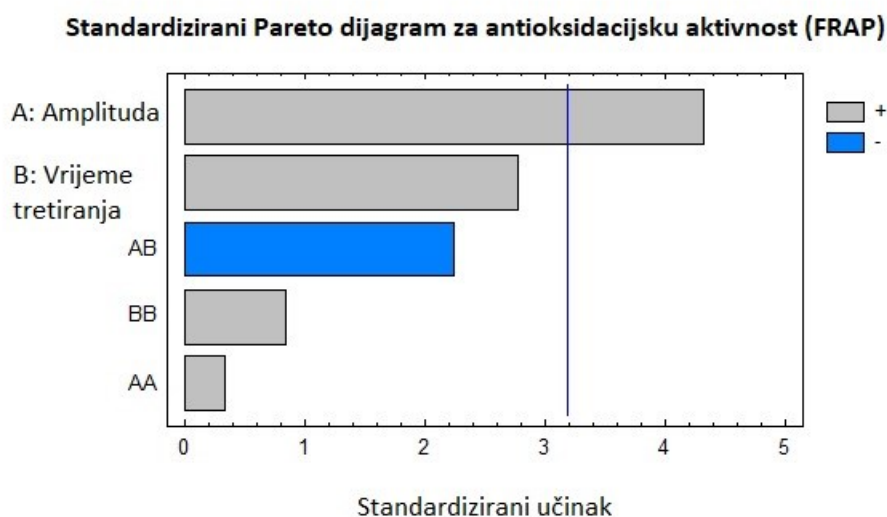
Prilog 16. Pareto dijagram tj. grafički prikaz utjecaja ulaznih vrijednosti amplitude ultrazvuka i vremena tretiranja na izlaznu vrijednost koncentracije ukupnih proteina uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta; AA – kvadratna interakcija amplitude ultrazvuka, BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja uzoraka, AB – međusobna interakcija amplitude i vremena tretiranja



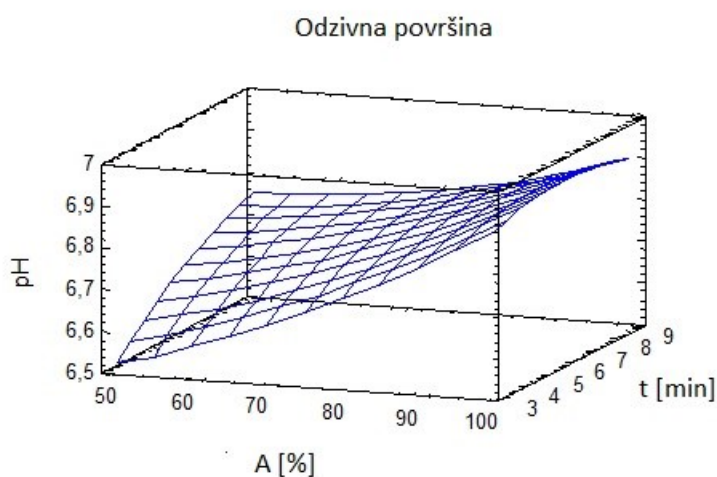
Prilog 17. Pareto dijagram tj. grafički prikaz utjecaja ulaznih vrijednosti amplitude ultrazvuka i vremena tretiranja na izlaznu antioksidacijska aktivnost uzoraka (DPPH) podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta; AA – kvadratna interakcija amplitude ultrazvuka, BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja uzoraka, AB – interakcija amplitude i vremena tretiranja



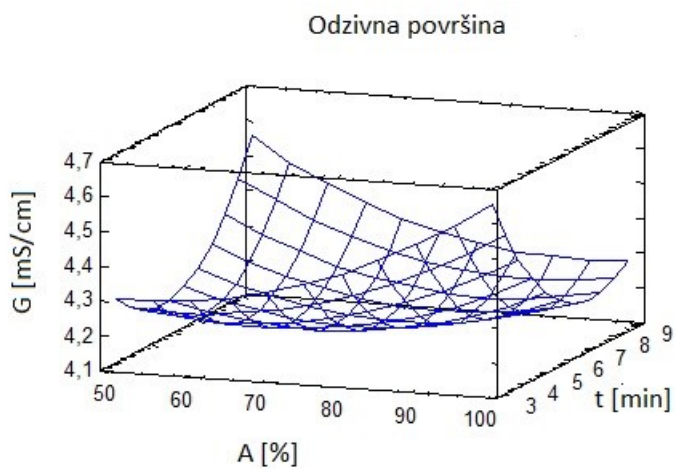
Prilog 18. Pareto dijagram tj. grafički prikaz utjecaja ulaznih vrijednosti amplitude ultrazvuka i vremena tretiranja na izlaznu antioksidacijska aktivnost uzoraka (FRAP) podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta; AA – kvadratna interakcija amplitude ultrazvuka, BB – kvadratna interakcija vremena tretiranja uzoraka, AB – interakcija amplitude i vremena tretiranja



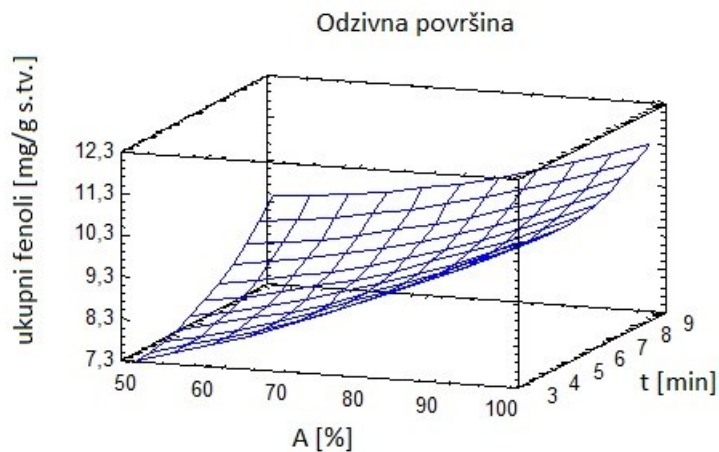
Prilog 19. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za pH uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta



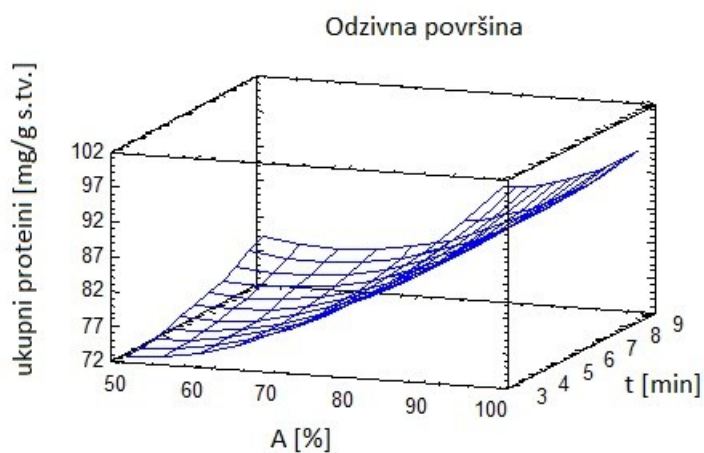
Prilog 20. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za električnu vodljivost uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta



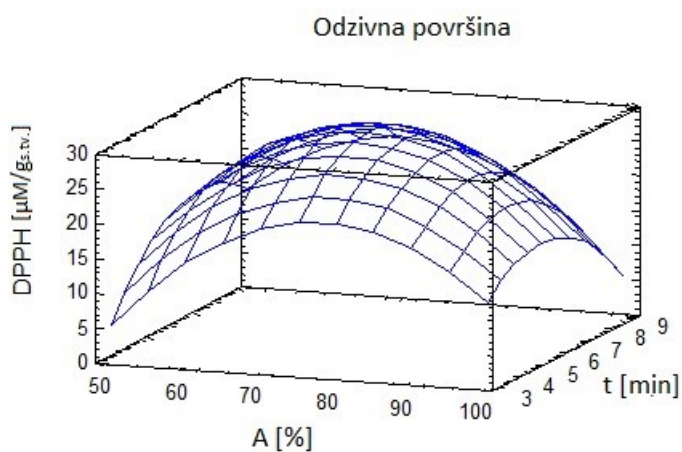
Prilog 21. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta



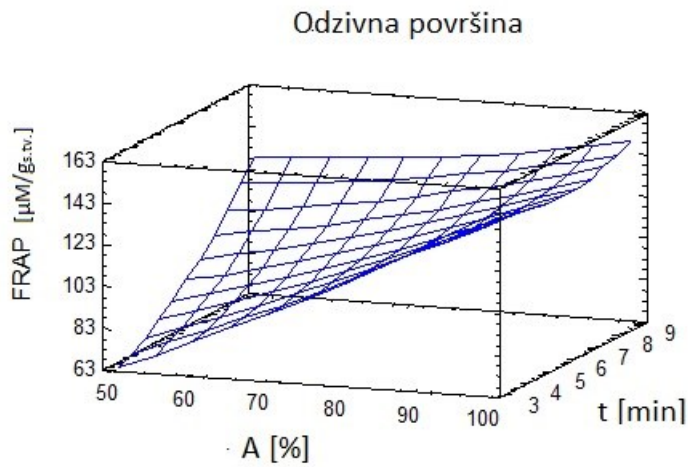
Prilog 22. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za koncentraciju ukupnih proteina uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta



Prilog 23. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za ukupne antioksidacijsku aktivnost uzoraka (DPPH) podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta



Prilog 24. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za ukupne antioksidacijsku aktivnost uzoraka (FRAP) podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta



Prilog 25. Jednadžba regresije za pH uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta; A – amplituda ultrazvuka, B – vrijeme tretiranja uzoraka

$$\text{pH} = 6,09744 + 0,00127333 \cdot A + 0,121556 \cdot B + 0,0000573333 \cdot A^2 - 0,00078 \cdot A \cdot B - 0,00357407 \cdot B^2$$

Prilog 26. Jednadžba regresije za električnu vodljivost uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta; A – amplituda ultrazvuka, B – vrijeme tretiranja uzoraka , G – električna vodljivost uzoraka

$$G = 4,89933 + 0,0102267 \cdot A - 0,119444 \cdot B + 0,0001552 \cdot A^2 - 0,00206667 \cdot A \cdot B + 0,0221111 \cdot B^2$$

Prilog 27. Jednadžba regresije za koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta; A – amplituda ultrazvuka, B – vrijeme tretiranja uzoraka

$$\text{Ukupni fenoli} = 6,27177 + 0,00637962 \cdot A - 0,123372 \cdot B + 0,000510383 \cdot A^2 - 0,00498931 \cdot A \cdot B + 0,0613442 \cdot B^2$$

Prilog 28. Jednadžba regresije za koncentraciju ukupnih proteina uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta; A – amplituda ultrazvuka, B – vrijeme tretiranja uzoraka

$$\text{Ukupni proteini} = 91,9542 - 0,913148 \cdot A + 1,4324 \cdot B + 0,0106255 \cdot A^2 - 0,0401277 \cdot A \cdot B + 0,145518 \cdot B^2$$

Prilog 29. Jednadžba regresije za antioksidacijsku aktivnost uzoraka (DPPH) podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta; A – amplituda ultrazvuka, B – vrijeme tretiranja uzoraka

$$\text{DPPH} = -138,791 + 3,3858 \cdot A + 13,8555 \cdot B - 0,0206043 \cdot A^2 - 0,052493 \cdot A \cdot B - 0,807865 \cdot B^2$$

Prilog 30. Jednadžba regresije za antioksidacijsku aktivnost uzoraka (FRAP) podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta; A – amplituda ultrazvuka, B – vrijeme tretiranja uzoraka

$$\text{FRAP} = -33,9767 + 1,51792 \cdot A + 10,543 \cdot B + 0,00574374 \cdot A^2 - 0,221212 \cdot A \cdot B + 0,972015 \cdot B^2$$

Prilog 31. Rezultati optimizacije ulaznih parametara za postizanje maksimalne izlazne vrijednosti pH uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta

Faktor	Najmanje vrijednosti	Najveće vrijednosti	Optimalne vrijednosti
Amplituda ultrazvuka (%)	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja (min)	3,0	9,0	6,09317

Prilog 32. Rezultati optimizacije ulaznih parametara za postizanje maksimalne izlazne vrijednosti električne vodljivosti uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta

Faktor	Najmanje vrijednosti	Najveće vrijednosti	Optimalne vrijednosti
Amplituda ultrazvuka (%)	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja (min)	3,0	9,0	3,0

Prilog 33. Rezultati optimizacije ulaznih parametara za postizanje maksimalne izlazne vrijednosti koncentracije ukupnih fenolnih spojeva uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta

Faktor	Najmanje vrijednosti	Najveće vrijednosti	Optimalne vrijednosti
Amplituda ultrazvuka (%)	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja (min)	3,0	9,0	9,0

Prilog 34. Rezultati optimizacije ulaznih parametara za postizanje maksimalne izlazne vrijednosti koncentracije ukupnih proteina uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta

Faktor	Najmanje vrijednosti	Najveće vrijednosti	Optimalne vrijednosti
Amplituda ultrazvuka (%)	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja (min)	3,0	9,0	3,0

Prilog 35. Rezultati optimizacije ulaznih parametara za postizanje maksimalne izlazne vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzoraka (DPPH) podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta

Faktor	Najmanje vrijednosti	Najveće vrijednosti	Optimalne vrijednosti
Amplituda ultrazvuka (%)	50,0	100,0	74,3181
Vrijeme tretiranja (min)	3,0	9,0	6,16163

Prilog 36. Rezultati optimizacije ulaznih parametara za postizanje maksimalne izlazne vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzoraka (FRAP) podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta

Faktor	Najmanje vrijednosti	Najveće vrijednosti	Optimalne vrijednosti
Amplituda ultrazvuka (%)	50,0	100,0	100,0
Vrijeme tretiranja (min)	3,0	9,0	9,0

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Adna Oraščanin 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