

Ekstrakcija enzima RuBisCO iz šećerne repe pomoću visokonaponskog električnog pražnjenja

Mavrić, Renata

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:159:899389>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Renata Mavrić

Ekstrakcija enzima RuBisCO
iz šećerne repe pomoću
visokonaponskog električnog
pražnjenja

Rad je izrađen u Laboratoriju za održivi razvoj na Zavodu za opće programe Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Laboratoriju za ekstrakciju proteina i elektroforezu na Zavodu za molekularnu biologiju na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak uz pomoć Josipe Dukić, mag. ing. te prof. dr. sc. Biljane Balen i Karle Košpić, mag. ing. Izrađen je u sklopu multidisciplinarnog projekta PRIMA H2020 GA2032 FunTomP-Functionalized Tomato Products.

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

EKSTRAKCIJA ENZIMA RuBisCO IZ ŠEĆERNE REPE POMOĆU VISOKONAPONSKOG ELEKTRIČNOG PRAŽNjenja

Renata Mavrić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058214592

Sažetak:

Provedeno je istraživanje utjecaja parametara visokonaponskog električnog pražnjenja (HVED) na ekstrakciju ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (RuBisCO) enzima iz svježih listova šećerne repe s ciljem valorizacije otpada šećerne industrije. HVED ekstrakcija provedena je uz uvođenje argona ili dušika pri 20 – 25 kV i 3 – 9 min. Izmjerena koncentracija ukupnih proteina u ekstraktu varirala je od $14,27 \pm 0,53$ mg/g s.t. do $34,90 \pm 1,59$ mg/g s.t., ovisno o primijenjenom naponu, vremenu tretmana i o radnome plinu. Optimalni parametri HVED ekstrakcije za maksimalni prinos ukupnih proteina su napon 20 kV i vrijeme tretmana 3 min. Western blot metodom detektirana je velika podjedinica RuBisCO enzima u području 55 kD. Kvatifikacija MRM (engl. *multiple reaction monitoring*) metodom pokazala je da radni plin znatno utječe na prinos koncentracije RuBisCO enzima. Prinos RuBisCO enzima HVED ekstrakcijom pri 25 kV i 6 min uz argon iznosi $81,32 \pm 0,73$ µg/mL, dok uz dušik $11,83 \pm 0,02$ µg/mL.

Ključne riječi: *RuBisCO, šećerna repa, plazma, HVED, netoplinske tehnike, valorizacija otpada*

Rad sadrži: 57 stranica, 14 slika, 12 tablica, 76 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Pomoć pri izradi: Josipa Dukić, mag. ing.; Karla Košpić, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Anita Slavica (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak/ (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Mojca Semenčić Čakić/ (član)
4. izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević (zamjenski član)

Datum obrane: 25. rujan, 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department for General Programmes
Laboratory for Sustainable Development

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

EXTRACTION OF RuBisCO ENZYME FROM SUGAR BEET BY MEANS OF HIGH VOLTAGE ELECTRICAL DISCHARGES

Renata Mavrić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058214592

Abstract:

Research was conducted to determine the influence of high voltage electrical discharges (HVED) parameters on the extraction of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) enzyme from fresh sugar beet leaves, aiming to valorize sugar industry waste. HVED extraction was executed at voltages of 20 – 25 kV for 3 – 9 minutes while introducing Argon or Nitrogen. Measured concentration of total proteins in the extracts varied from 14.27 ± 0.53 mg/g d.m. to 34.90 ± 1.59 mg/g d.m., depending on the applied voltages, treatment time and input gas. The optimal HVED extraction parameter to obtain maximal yield was 20 kV and 6 minutes. RuBisCO enzyme's big subunit was detected at 55 kDa. Quantification of RuBisCO enzyme using multiple reaction monitoring method showed the impact of input gas on the yield of RuBisCO. Yield of RuBisCO at 25 kV and 6 min using Argon was 81.32 ± 0.73 µg/mL, while using Nitrogen 11.83 ± 0.02 µg/mL.

Keywords: *RuBisCO, sugar beet, plasma, HVED, nonthermal processing, waste valorization*

Thesis contains: 57 pages, 14 figures, 12 tables, 76 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Anet, Režek Jambrak, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Josipa Dukić, MSc; Karla Košpić, MSc

Reviewers:

1. Anita, Slavica, PhD, Full professor (president)
2. Anet Režek Jambrak, PhD, Full professor (mentor)
3. Mojca Semenčić, PhD, Associate professor (member)
4. Igor Stuparević, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: September 25th, 2023

ZAHVALA

Veliko hvala dragoj mentorici, prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak, koja me je vodila i usmjeravala tijekom preddiplomskog i diplomskog studija. Potičući moj razvoj, ostavili ste bitan utisak na moju buduću karijeru, i na tome ću Vam zauvijek biti duboko zahvalna. Ovaj rad ne bi bio moguć bez Josipe Dukić, mag. ing. te sam veoma zahvalna na Vašoj nesebičnoj pomoći, brojnim savjetima i velikoj susretljivosti s kojom ste me dočekali i s kojom ste me proveli kroz izradu i pisanje diplomskog rada. Također zahvaljujem Karli Košpić, mag. ing. te prof. dr. sc. Biljani Balen na pomoći i usmjeravanju pri izradi rada na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu.

Svojoj obitelji i dragim prijateljima koje sam stekla tijekom studiranja upućujem veliko hvala što ste uvijek bili tu za mene, slušali me, poticali, i najvažnije, vjerovali u moj uspjeh.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ODRŽIVI RAZVOJ	2
2.2. ŠEĆERNA REPA	4
2.2.1. Valorizacija otpada šećerne industrije	4
2.2.2. Listovi šećerne repe	5
2.2.3. Proteinske frakcije	5
2.3. EKSTRAKCIJA	8
2.3.1. Pojava alternativnih tehnika ekstrakcije	8
2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem	9
2.3.3. Fenolna ekstrakcija	11
2.4. KVANTITATIVNO I KVALITATIVNO ODREĐIVANJE RUBISCO ENZIMA	12
2.4.1. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu	12
2.4.2. Western blot metoda	13
2.5. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA S MASENOM SPEKTROMETRIJOM	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Listovi šećerne repe	17
3.1.2. Kemikalije i standardi	17
3.1.3. Priprema otopina.....	19
3.1.4. Aparatura i pribor	22
3.2. METODE	23
3.2.1. Dizajn eksperimenta i statistička analiza podataka.....	23
3.2.2. Ekstrakcije lista šećerne repe.....	24
3.2.3. Kvantitativno i kvalitativno određivanje RuBisCO enzima	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	33
5. ZAKLJUČCI	47
6. LITERATURA	48

1. UVOD

Šećerna repa uzgaja se u svrhu dobivanja konzumnog šećera, pri čemu nastaje značajna količina otpada (Tomaszewska i sur., 2018). Prehrambeni otpad važna je problematika s negativnim konotacijama za klimatske promjene (Smetana i sur., 2018). Listovi šećerne repe, kao primarni otpad procesiranja, potencijalni su izvor proteina za prehranu ljudi (Akyüz i Ersus, 2021).

Na važnost istraživanja ekstrakcije proteina iz biljaka ukazuje projekcija da će u 2054. godini trećina proteina za prehranu ljudi biti biljnoga podrijetla (Miliãoa i sur., 2022). Biljni proteini mogu biti dobiveni iz otpada (i nusproizvoda) poljoprivredne i prehrambene industrije. Ekonomična su zamjena proteinima životinjskog podrijetla te se, osim svestranom primjenom, odlikuju i po pitanju nutritivne vrijednosti (Sá i sur., 2020). Mar Contrerasa i sur. (2019) ukazuju na visoku dostupnost otpada prehrambene industrije što, uz niske cijene sirovine, može kompenzirati niži udio proteina u početnoj sirovini. Zbog nutritivne vrijednosti te visoke zastupljenosti u otpadu poljoprivredne i prehrambene industrije, listovi šećerne repe imaju potencijalnu primjenu u svrhe obogaćivanja prehrambenih proizvoda proteinima (Tenorio, 2017). Kontinuirani rast ljudske populacije dovodi do pritiska na prehrambeni sektor. Projekcije indiciraju da će 2050. godine populacija iznositi 10 milijardi ljudi, što iziskuje osiguranje dovoljne količine održive hrane koja zadovoljava nutritivne potrebe i razvoj novih trendova konzumacije (Sá i sur., 2020; Fasolin i sur., 2019). S obzirom na to, iskorištavanje prehrambenog otpada, poput listova šećerne repe, u svrhu obogaćivanja prehrane ljudi od velike je važnosti za zadovoljavanjem potrebe čovječanstva u budućnosti.

Cilj ovoga istraživanja dobiti je bolje razumijevanje o netoplinskoj ekstrakciji ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (RuBisCO) enzima (topljivog proteina koji se nalazi unutar kloroplasta biljaka), iz listova šećerne repe pomoću visokonaponskog električnog pražnjenja. Postupci koji su korišteni u izradi diplomskog rada jesu toplinska ekstrakcija, netoplinska ekstrakcija pomoću visokonaponskog električnog pražnjenja i fenolna ekstrakcija, te Western Blot i MRM (engl. *multiple reaction monitoring*) metode za kvalitativnu i kvantitativnu analizu ekstrakata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ODRŽIVI RAZVOJ

Prehrambeni otpad stvara značajno opterećenje na okoliš. Prema službenoj internetskoj stranici ciljeva održivog razvoja (engl. *Sustainable Development Goals, SDG*) (UN, 2022), godišnje se trećina proizvedene hrane pokvari uslijed neodgovornog ponašanja potrošača, tijekom transporta ili neadekvatnog postupka berbe. SDG ukazuju na žurnost rješavanja problema stvaranja velike količine prehrambenog otpada i potrebe za iskorištavanjem nusproizvoda proizvodnje u prehrambenome lancu. Unutar skupa od sedamnaest ciljeva direktan utjecaj na temu ovog diplomskog rada imaju drugi cilj: Svijet bez gladi (engl. *Zero hunger*) i dvanaesti cilj: Osigurati održivu potrošnju i proizvodnju (engl. *Responsible Consumption and Production*). Ujedinjeni Narodi osnovali su okvir ciljeva održivog razvoja 2015. godine te je prihvaćen u nacionalne strategije diljem svijeta (UN, 2022).

Prehrambeni otpad se može svrstati u dvije kategorije s obzirom na izvor: otpad biljnog i otpad animalnog podrijetla (Rocha i sur., 2018) te s obzirom na podrijetlo: hortikulturni otpad, otpad iz uzgoja stoke te otpad iz prehrambene industrije (Amran i sur., 2021). Otpad nastaje u svim fazama prehrambenog lanca, uključujući agrikulturnu proizvodnju, rukovanje nakon berbe i tijekom skladištenja, procesiranja, distribucije i potrošnje (Rocha i sur., 2018). Raščlanjeni udjeli količine prehrambenog otpada proizvedenog u različitim sektorima iznosili su: 42 % otpada iz kućanstva, 39 % pri industrijskoj proizvodnji, 14 % u ugostiteljstvu te svega 5 % u trgovinama prehrambenom robom (Ačkar i sur., 2022). Procjenjuje se da je gotovo polovica hortikulturnih proizvoda, odnosno voća, povrća i usjeva, odbačeno kao otpad (Hussain i sur., 2020). Godišnju količinu prehrambenog otpada Ačkar i sur. (2022) procijenili su na 100 milijuna tona za područje Europske Unije, što rezultira stvaranjem oko 3,3 milijarde tona ugljikova dioksida.

Primjena otpada iz agrikulture i iz prehrambene industrije jedno je od ključnih rješenja za unapređenje održivosti sadašnje proizvodnje hrane. Glavni načini rješavanja otpada uključuju: prevenciju, valorizaciju za prehranu ljudi i životinja uz mogućnost ekstrakcije visokovrijednih tvari, ponovnu upotrebu za proizvodnju energije ili topline, kompostiranje ili odlaganje otpada (Smetana i sur., 2018). Zbrinjavanje otpada zahtjeva resurse poput vode, zemlje, radne snage, energije i financija, stoga je primaran način rješavanja problema prehrambenog otpada spriječiti njegovo nastajanje. Sprečavanje nastajanja prehrambenog otpada i nusproizvoda u prehrambenom lancu za četvrtinu količine doprinijelo bi proizvodnjom hrane dostatnom za prehranu 12 % sadašnje ljudske populacije (Ačkar i sur., 2022). Ipak, otpad je pretežno

nedovoljno iskorišten, a primjenjuje se samo u proizvodnji bio-goriva i komposta (Hussain i sur., 2020). Valorizacija prehrambenog otpada kao bitna komponenta gospodarenja otpadom važan je izazov prehrambenoj industriji (Tylewicz i sur., 2022). Odnosi se na procesiranje otpada na industrijskoj razini kao rješenje za odlaganje, a koncept valorizacije podrazumijeva da se svaki otpadni materijal ili nusproizvod može pretvoriti u proizvod (Amran i sur., 2021). Valorizacija omogućava pretvorbu prehrambeno-poljoprivrednog otpada u proizvode s dodanom vrijednosti te povećava efikasnost upravljanja otpadom, odnosno povećava održivost s obzirom na prirodne resurse (Hussain i sur., 2020). Nadalje, iskorištavanje otpada i/ili nusproizvoda doprinosi ekonomskoj održivosti procesa i omogućuje bolje upravljanje resursima (Ačkar i sur., 2022). Osim umanjivanja troškova prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Li i sur., 2019), valorizacija otpada umanjuje troškove i lokalnim zajednicama koje se bave uzgojem hrane (Amran i sur., 2021).

Prehrambena industrija istražuje upotrebu novih i održivih izvora proteina poput biljaka, insekata i algi, radi zadovoljavanja potreba potrošača te radi ograničavanja unosa proteina životinjskog podrijetla (Franca-Oliviera i sur., 2021). Biljni otpad i nusproizvodi prehrambene industrije sadrže značajne količine bioaktivnih tvari, vitamina i minerala što ih čini vrijednom sirovinom (Ačkar i sur., 2022; Hussain i sur., 2020). Ekstrakcijom tih visokovrijednih tvari dobivaju se nove sirovine s poželjnim tehnoloških funkcijama (prehrambena bojila, konzervansi, stabilizatori, emulgatori i sl.), nutritivnim sastavom (izvor proteina, vitamina, esencijalnih masnih kiselina, vlakana i sl.) i pozitivnim utjecajem na zdravlje ljudi ili životinja (nutraceutici, bioaktivne molekule, antioksidansi i sl.) (Puértolas i Barba, 2016).

Ekstrahiranje proteina iz agroindustrijskog otpada i nusproizvoda održiv je način minimiziranja odlaganja otpada i maksimiziranja ulaznih resursa. Obogaćivanje proizvoda ekstrahiranim proteinima daje dodatnu vrijednost konačnom proizvodu na tržištu zbog mogućnosti isticanja poboljšane inovativnosti, održivosti i nutritivne vrijednosti (Sá i sur., 2020). Osim toga, zadovoljava i potrebe koje nameću potrošači u novije doba koje su, osim socioekonomskih i ekoloških faktora, funkcionalnost i povoljan utjecaj hrane na zdravlje (Fasolin i sur., 2019). Tenorio (2016) navodi usjeve koji su razmatrani za primjenu proteina iz listova kao mogući značajan izvor proteina za prehranu ljudi. Prema kriterijima udjela proteina, dostupnosti, potrebama društva i mogućnosti primjene spomenute su alfalfa klice, špinat, manioka, moringa, konjska rotkvica i duhan, a posebno su istaknuti listovi koji su otpad od masovnog uzgoja usjeva poput šećerne repe, manioke, ječma te brokule.

2.2. ŠEĆERNA REPA

Beta vulgaris subsp. *maritima* (L.) predak je iz kojega su se razvili ostali kultivari koji dijele ime *B. vulgaris* (L.) subsp. *vulgaris*: šećerna repa (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *altissima*), krmna repa (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *alba*), blitva (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *cicla*) i cikla (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *conditiva*) (Abd El-Wahab i sur., 2022). Navedeni kultivari imaju značajnu svjetsku ekonomsku važnost, osobito šećerna repa čija je svjetska proizvodnja 2019. godine iznosila preko 275 milijuna tona u svijetu (Goldman i Janick, 2021). Uzgoj šećerne repe zadovoljava jednu trećinu svjetske potrebe za šećerom, a osim toga je i značajan izvor bioenergije (Jung i sur., 2015).

2.2.1. Valorizacija otpada šećerne industrije

Šećerna repa primarno se koristi za proizvodnju rafiniranog šećera (saharoze) (Tomaszewska i sur., 2018). Prema podacima službene internetske stranice Organizacije za prehranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agricultural Organization, FAO*) šećerna repa je ulazna sirovina za 16 % svjetske proizvodnje šećera (FAO, 2022). Tijekom procesiranja šećerene repe za proizvodnju šećera odbacuju se listovi, a uz to nastaju pulpa (repini rezanci) i otpadna melasa kao nusproizvodi u različitim fazama proizvodnje. Udio u energetske vrijednosti otpada i sporednih proizvoda koji su zabilježeni u istraživanju Marinković i sur. (2004) iznose: udio glave i listova 35,2 %; repinih rezanca 32,2 %; melase 32,6 %. Pojedinačni udjeli ovise o sorti, agroekološkim uvjetima proizvodnje i mineralnoj hranidbi šećerne repe (Marinković i sur., 2004).

Primarni otpad šećerne industrije su listovi šećerne repe koji sačinjavaju 20 – 30 % biljke, a odvajaju se u predobradi šećerne repe prije ulaza u tvornicu (Dukić i sur., 2022). Iako se šećer stvara u listovima, kontinuirano se odvodi i skladišti u korijenu (Caliceti i sur., 2022). Listovi koji se odbacuju prilikom berbe rezultiraju velikom količinom biomase godišnje (Tenorio, 2017). Zabilježeno je iskorištavanje listova šećerne repe u svrhu biorafinacije (Caliceti i sur., 2022). Isto tako, zabilježeni su pokušaji proizvodnje metanola iz listova i kiselinske hidrolize u svrhu dobivanja furfurala (Tomaszewska i sur., 2018). Osim ekstrakcije i pročišćavanja topljivih proteinskih frakcija iz listova, listovi sadrže i druge visokovrijedne tvari kao što su vlakna, minerali i specijalizirani biljni metaboliti (Dukić i sur., 2022). Važno je pristupiti iskorištavanju otpada u sveobuhvatnom pristupu s ciljem minimiziranja prehrambenog otpada. Pretvorba nusproizvoda u proteinske hidrolizate, koncentrate i izolate proteina rezultira proizvodima s visokom dodanom vrijednosti, visokom probavljivošću proteina te uravnoteženim sastavom aminokiselina (Sá i sur., 2020).

2.2.2. Listovi šećerne repe

Kemijski sastav listova šećerne repe varira s obzirom na sortu, vrijeme berbe i agro-ekološke uvjete poput geografskog područja, klimatskih uvjeta i karakteristika tla (Akyüz i Ersus, 2021; Marinković i sur., 2004). Ukupna suha tvar svježih listova u rasponu je od 14,6 – 15,8 % prema Caliceti i sur. (2022), 12 – 14 % prema Berlowska i sur. (2018), a u istraživanju Tenorio i sur. (2016) iznosila je 12 %. Listovi šećerne repe potencijalna su sirovina za izolaciju proteinskih koncentrata jer su bogati proteinima, a i drugim visokovrijednih tvarima poput vitamina A (Berlowska i sur., 2018) i betaina (Takabe i sur., 2015). Udio proteina u svježim listovima prema istraživanju Akyüz i Ersus (2021) iznosio je 24,02 % na suhu tvar, a prema istraživanju Tenorio i sur. (2016) 14,8 %, odnosno Tenorio i sur. (2017) 19,4 % na suhu tvar. Proteini iz listova šećerne repe nutritivno su bogati i imaju uravnoteženi sastav aminokiselina (Milião i sur., 2022; Akyüz i Ersus, 2021). Sadrže značajne količine esencijalnih aminokiselina: leucina ($9,19 \pm 0,26$ %), valina ($6,12 \pm 0,13$ %), fenilalanina ($5,90 \pm 0,14$ %), lizina ($6,50 \pm 0,38$ %), treonina ($5,05 \pm 0,10$ %), izoleucina ($4,95 \pm 0,09$ %) i metionina ($2,08 \pm 0,09$ %). Navedene vrijednosti variraju s obzirom na način uzgoja (u stakleniku ili na polju) (Dukić i sur., 2022; Kiskini i sur., 2016).

2.2.3. Proteinske frakcije

Biljni proteini razvrstavaju se na albumine, globuline, prolamine i gluteline, pri čemu svaka grupa ima različita tehnološka svojstva (Fasolin i sur., 2019). U prosjeku samo 20 % proteina koji se nalaze u listu šećerne repe, točnije stromi kloroplasta, čine topljivi proteini (Tenorio i sur., 2016), dok ostatak sačinjavaju netopljivi proteini koji grade staničnu membranu, membranu i tilakoide kloroplasta i membranu vakuole (Nynäs i sur., 2021; Jung i sur., 2015). Ekstrakciju topljivih proteina ometaju čvrste stanične stijenke s kompleksnim strukturama poput celuloze, pektina, hemiceluloze i glikoproteina (Žuntar i sur., 2019; Andersson i Backlund, 2008). Topljivi proteini podijeljeni su u dvije frakcije, proteini frakcije 1 (engl. *fraction 1 protein, F-1-p*) te proteini frakcije 2 (engl. *fraction 2 protein, F-2-p*) (El-Meleigi i sur., 1980). F-1-p čini enzim ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (RuBisCO) koji se akumulira unutar kloroplasta i nužan je u procesima fotosinteze i fotorespiracije (Andersson i Backlund, 2008). Ostatak topljivih proteina spadaju u F-2-p, a nalaze se u staničnoj membrani (El-Meleigi i sur., 1980). U istraživanju Nynäs i sur. (2021) F-2-p frakcija izolirana je snižavanjem pH vrijednosti otopine proteina listova, odvojenih od netopljive frakcije na pH vrijednost 4,5, dok su u istraživanju Martin i sur. (2019) izolirani centrifugiranjem. Procesima separacije se izdvajaju proteine koji su nutritivno bogati i

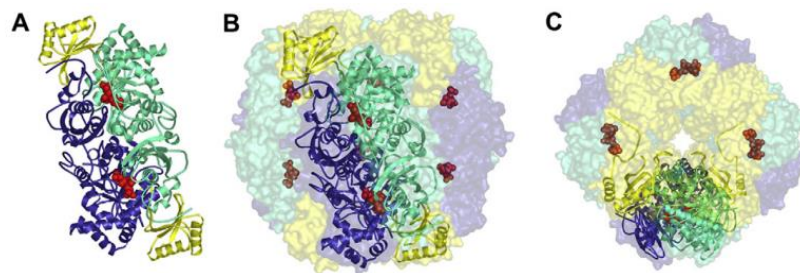
prikladni za prehranu ljudi od nepoželjnih tvari u listovima poput alkaloida i nekih polifenolnih spojeva (Mar Contrerasa, 2019). Zbog vrlo poželjnog aminokiselinskog sastava i funkcionalnih svojstava RuBisCO je zanimljiv ciljani protein za obogaćivanje nove hrane biljnim proteinima (Nynäs i sur., 2021). Dominantne aminokiseline, prema Udenigwe i sur. (2017) RuBisCO enzima iz alfa alfa jesu alanin, glicin i leucin za veliku podjedinicu, te glutamat i leucin za malu podjedinicu. Zbog zastupljenosti hidrofobnih aminokiselina, RuBisCO bi mogao biti sirovina za proizvodnju hidrofobnih bioaktivnih peptida.

2.2.3.1. RuBisCO enzim

RuBisCO (EC 4.1.1.39) je ključni enzim koji katalizira prvi, ograničavajući korak fotosinteze u kojemu dolazi do karboksilacije ribuloze-1,5-bisfosfata (RuBP), odnosno asimilacije ugljikova dioksida pri čemu nastaju dvije molekule 3-fosfoglicerata (Andersson i Backlund, 2008; Parry i sur., 2003). Osim katalize reakcije karboksilacije RuBP, RuBisCO također katalizira reakciju fotorespiracije, odnosno oksigenacije RuBP, zbog čega je izuzetno neefikasan katalitički enzim fotosinteze (Andersson i Backlund, 2008). Kako bi se kompenzirao nizak obrtni broj, odnosno niska učinkovitost enzima, biljke akumuliraju značajno veliku količinu enzima u listovima, čineći RuBisCO najbrojnijim proteinom na zemlji (Di Stefano i sur., 2018). Znanstvenici procjenjuju da je nastao prije 3 milijarde godina, kada je u atmosferi bila viša koncentracija ugljikova dioksida i niža koncentracija kisika. Tijekom postupene prilagodbe na promijene uvjeta atmosfere do sadašnje strukture enzima, zadržali su se kompleksni reakcijski mehanizmi koji su nastali pri drukčijim, povijesnim uvjetima (Di Stefano i sur., 2018).

RuBisCO ima vrlo veliku molekulsku masu (560 kDa), zbog čega se ubraja i među najveće enzime u prirodi (Di Stefano i sur., 2018). Prisutan je u većini autotrofnih organizama, uključujući kopnene i vodene biljke, eukariotske alge, cijanobakterije i fotosintetske bakterije. Postoje četiri organizacijske strukture RuBisCO enzima: I, II, III i IV (Andersson i Backlund, 2008). Sve strukture su multimerne, sačinjene od više podjedinica. Struktura I dominantna je u višim biljkama, algama i cijanobakterijama. Sačinjena je od osam velikih podjedinica (L) i osam malih podjedinica (S), često prikazana kao L8S8 (Barbeau i Kinsella, 1988). Velika podjedinica sadrži većinu aktivnih mjesta enzima te se naziva i katalitička podjedinica, a ima molekulsku masu 55 kDa. Manja podjedinica ima molekulsku masu 12,5 kDa i nije esencijalna za katalitičku aktivnost (Andersson i Backlund, 2008; Lamsal i sur., 2007). Na slici 1 prikazana je struktura forme I, pri čemu je L8S8 građena od 4 dimernih jedinica velike podjedinice smještenih oko četverostrukih osi, na čijem kraju se nalaze po dvije male

podjedinice za svaki dimer (Di Stefano i sur., 2018; Andersson i Backlund, 2008).



A) Prikazuje L2S2 građevnu jedinicu pri čemu su velike podjedinice prikazane plavom i zelenom bojom, a male žutom. Crvenom bojom prikazan je supstrat. Prikazi cjelokupne strukture I, L8S8 i simetrije s obzirom na B) dvostruku os i C) četverostruku os (Andersson i Backlund, 2008)

Slika 1. Prikaz građe strukture forme I RuBisCO enzima

Svojstva RuBisCO enzima se mogu podijeliti na tehnološka i nutritivna svojstva.

Tehnološka svojstva opisuju način na koji se protein ponaša u sustavu hrane, a njih uvjetuje priroda i jačina međumolekulskih interakcija, ali i interakcije RuBisCO enzima s ostalim komponentama sustava (Amagliani i sur., 2017). Ona ovise o vrsti biljke iz koje je izoliran, vremenu berbe i geografskim uvjetima (Akyüz i Ersus, 2021). Topljivost je osnovno tehnološko svojstvo proteina jer o njemu ovise druga svojstva poput geliranja, emulgiranja, vezanja masti i vode i pjenjenja. Na njega utječe pH otopine, temperatura, ionska jakost, prisustvo bivalentnih kationa, koncentracija proteina, ali i biljna vrsta iz koje je protein izoliran (Di Stefano i sur., 2018). Biljne proteine karakterizira niska topljivost, jer su topljivi proteini prisutni u niskim koncentracijama i njihova ekstrakcija je otežana zbog prisustva vakuola i staničnih stijenki (Mar Contrerasa i sur., 2019). RuBisCO izoliran iz šećerne repe ima visoku topljivost pri pH vrijednostima do 4,0 i iznad 6,0 ($\geq 80\%$), što je u skladu s očekivanjima s obzirom na to da je topljivost najniža pri izoelektričnoj točki (pI) proteina, a pI vrijednost RuBisCO proteina varira o vrsti između pH vrijednosti 4,6 i 5,5 (Martin i sur., 2014). Akyüz i Ersus (2021) navode da je topljivost koncentrata proteina šećerne repe najmanja pri pH 4,5, a najveća pri pH 7,5, što pripisuju hidrofiličnim aminokiselinskim ostacima u proteinu. Sposobnost pjenjenja i emulgiranja koncentrata RuBisCO iz šećerne repe bolja su pri pH 4,0 od onih pri pH 7,0 (Martin i sur., 2014). Sposobnost pjenjenja povećava se pri izoelektričnoj vrijednosti proteina, jer su tada međuproteinske elektrostatske interakcije minimalne, a sloj molekula proteina na granici voda-zrak najveće gustoće (Di Stefano i sur., 2018). Martin i sur. (2014) pokazali su da je sposobnost geliranja koncentrata RuBisCO iz šećerne repe vrlo impresivna te je za geliranje potrebno 50 – 66 % manje proteina u usporedbi s koncentratom proteina sirutke i koncentratom proteina soje.

Nutritivna vrijednost proteina opisana je aminokiselinskim sastavom i mogućnošću stvaranja

bioaktivnih peptida, odnosno specifičnih proteinskih fragmenata koji doprinose zdravlju ljudi (Di Stefano i sur., 2018). Kao što je gore spomenuto, RuBisCO je izvor esencijalnih aminokiselina. Njegova nutritivna vrijednost i probavljivost vrlo je dobra. Također, nema značajan alergenski potencijal. Potrebno je istaknuti da je prije konzumacije RuBisCO proteina potrebno ukloniti antinutritivne tvari koji se nalaze u listovima biljaka (Di Stefano i sur., 2018).

2.3. EKSTRAKCIJA

2.3.1. Pojava alternativnih tehnika ekstrakcije

Korak ekstrakcije je kritičan korak iskorištavanja otpada koji mora biti adekvatno postavljen u odnosu na željeni produkt ekstrakcije i s obzirom na sustav u kojem je ta tvar uklopljena. Ekstrakcija treba težiti ekonomskoj i tehnološkoj izvedivosti kako bi bila održiva metoda valorizacije otpada (Puertolas i Barba, 2016). Konvencionalne metode ekstrakcije široko su zastupljene u industriji tijekom posljednjih nekoliko desetljeća zbog jednostavnosti operacija i potrebne opreme. Ipak, takve metode poput vrenja, toplinskog refleksa, ekstrakcije po Soxhlet-u i ostale toplinske metode, danas se smatraju neučinkovitima zbog dugog procesnog vremena, potrebe za visokom količinom otapala i energije te drugim nedostacima zbog kojih se smanjuje prinos ekstrakcije (Li i sur., 2019). Primjena konvencionalnih metoda ekstrakcije u pravilu rezultira nižim prinosom proteina, jer dolazi do degradacije proteina uslijed primjene ekstremnih pH vrijednosti, visoke temperature i dugog vremena ekstrakcije. Takvi uvjeti uzrokuju promjenu konformacije i funkcije proteina, što se odražava na smanjenje nutritivne vrijednosti i bioaktivnih spojeva (Franca-Oliviera i sur., 2021).

Fokus se pomiče na istraživanje netoplinskih, zelenih tehnologija za poboljšavanje efikasnosti ekstrakcije i smanjenja degradacije proteina. Prednosti ovih tehnologija uključuju smanjenje negativnog utjecaja na okoliš i minimizaciju uporabe toksičnih reagensa i otapala. Nadalje, doprinose povećanju prinosa, potencijalnom poboljšanju nutritivnih i tehnološko-funkcionalnih svojstava te mogu omogućiti ekstrakciju bioaktivnih peptida iz biljnih izvora (Franca-Oliviera i sur., 2021). U netoplinske tehnike ubrajamo ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, visoki hidrostatski tlak, visokonaponsko električno pražnjenje, pulsirajuće električno polje i slične tehnike (Li i sur., 2019). Među njima se razlikuju tehnike koje se baziraju na primjeni električne struje, s dodatnom klasifikacijom prema tipu struje koja se primjenjuje (jednosmjerna ili dvosmjerna), primjeni pulseva, snage električnog polja te razvijanju topline (Franca Oliviera i sur., 2021; Rocha i sur., 2018).

2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem

Visokonaponsko električko pražnjenje (engl. *high voltage electrical discharge, HVED*) netopliniska je tehnika koja izbojima visokog napona generira električno polje, a posljedično i plazmu i omogućuje djelotvornu ekstrakciju. Bazira se na formaciji pora u staničnoj membrani, odnosno fenomenu elektroporacije, kao posljedici djelovanja stvorenog električnog polja. Elektroporacija je ključna za omogućavanje prijenosa mase, odnosno ekstrakcije unutarstaničnih komponenti procesom difuzije u izvanstanični prostor (Franca Oliviera i sur., 2021).

2.3.2.1. Mehanizam djelovanja

Mehanizam fizikalno-kemijskog djelovanja HVED-a, uzorkovan je direktnim uvođenjem energije u tekuće okuženje putem plazme (ionizacija plina) koja je stvorena primjenom visokog napona i intenziteta kratkotrajnih pulseva između dviju elektrode (Chemat i sur., 2020). Primijenjeni napon u razmjerima je od 30 do 40 kV, intenzitet struje u vrijednosti oko 10 kA, a pulsevi u trajanju od nekoliko μ s do ms (Tena i Asuero, 2022; Puertolas i Barba, 2016).

Plazma je pojam uveden 1928. godine kojim se opisuje četvrto stanje tvari koje podrazumijeva potpuno ili djelomično ionizirano stanje plina (Thirumdas i sur., 2015). Plazma se sastoji od kationa, aniona, radikala, elektrona te pobuđenih i nepobuđenih atoma, a nastaje kao rezultat izlaganja plina izvoru energije. Kategorizira se na termičku i netermičku plazmu, ovisno o gustoći i temperaturi elektrona (Tolouie i sur., 2018). Dok termička plazma ima dovoljno visoku energiju da su sve čestice u ravnoteži i u sudarima međusobno ne prenose energiju, netermička plazma nije u stanju termodinamičke ravnoteže te elektroni imaju višu energiju od gušćih čestica, zbog čega se događa prijenos energije prilikom sudara (Niemira, 2012). Netermička, hladna plazma generirana je na temperaturama bliskim sobnoj temperaturi te nema djelovanje termičke degradacije na hranu i mikroorganizme (Niemira, 2012). Može se generirati iz različitih izvora pražnjenja i pri različitim tlakovima, a prilikom HVED ekstrakcije plazma se proizvodi izlaganjem plina električnom polju između dvije elektrode (Thirumdas i sur., 2015), odnosno pri korona pražnjenju. Korona pražnjenje (engl. *corona discharge*) lokaliziran je tip emisije pri atmosferskom tlaku za koji je potrebno relativno jako i nehomogeno električno polje, a koriste se elektrode opremljene s visokonaponskim sistemom za ionizaciju plina (Tolouie i sur., 2018). Plin koji se koristi za stvaranje plazme može biti zrak ili plemeniti plinovi poput helija i argona, te njihove mješavine (Tolouie i sur., 2018).

Djelovanje HVED ekstrakcije može se podijeliti u dvije faze. Tijekom faze predraspada dolazi do relativno slabih šok valova i formacije malih mjehurića, pri čemu se stvara UV radijacija i aktivni radikali. Prilikom prijelaza u sljedeću fazu, fazu raspada, dolazi do pojačanja intenziteta djelovanja, tj. jačih šok valova, visoke koncentracije slobodnih radikala, mjehurića s plazmom u unutrašnjosti i snažne turbulencije (Puertolas i Barba, 2016). Djelovanje HVED ekstrakcije proizlazi iz djelovanja hladne plazme, a to su formacija reaktivnih vrsta (kisikovih i dušikovih reaktivnih vrsta) i ubrzanje kemijskih reakcija poput oksidacije ili reakcija polimerizacije (Tolouie i sur., 2018). Također hladna plazma može uzrokovati i fotokemijske reakcije zbog emisije ultraljubičastog (engl. *ultraviolet*, UV) zračenja pri tretmanu plazmom (Tolouie i sur., 2018). Zbog navedenih procesa dolazi do mehaničkog oštećenja staničnih tkiva, osobito genetičkog materijala zbog UV zračenja, i oksidacije uzrokovane slobodnim radikalima, te je moguća oksidacija bioaktivnih komponenata (Tena i Asuero, 2022; Li i sur., 2019).

2.3.2.2. Primjena HVED ekstrakcije

Ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem kao samostalna metoda ekstrakcije istražena je na različitim materijalima u svrhu dobivanja vrijednih spojeva te kao predtretman za povećanje prinosa ekstrakcije ulja, proteina i polisaharida (Puertolas i Barba, 2016). Moguća je primjena HVED ekstrakcije željenih unutarstaničnih tvari u svrhu valorizacije biomase kao održive ulazne sirovine za biorafinaciju (Rocha i sur., 2018). Iskoristive sirovine koje se mogu valorizirati uključuju proteine, peptide, polisaharide i oligosaharide, vlakna, lipide te sekundarne biljne metabolite poput karotenoida i polifenola (Rocha i sur., 2018).

Barba i sur. (2015) zabilježili su maksimalan prinos proteina iz sjemenki uljane repice ($9,41 \pm 0,30$ g/100 g) te pogače uljane repice ($15,76 \pm 0,63$ g/100 g) šaržnim tretmanom HVED ekstrakcijskog sustava pri parametrima procesa ulazne energije od 240 kJ/kg i omjeru tekuće:kruto od 20:1. Inicijalna maksimalna vrijednost napona u eksperimentu bila je 40 kV, razmak između pražnjenja 2 s, a trajanje pražnjenja $\approx 0,5 \pm 0,1$ μ s. Rezultati su u skladu s očekivanjima, s obzirom na to da je u pogači koja je nusproizvod proizvodnje ulja početni udio suhe tvari (posljedično i proteina) viši. U skladu s njihovim rezultatima, Roselló-Soto i sur. (2014) također bilježe značajan porast prinosa proteina s HVED predtretmanom. Istraživanje Roselló-Soto i sur. (2014) provedeno je na koštici masline, pri čemu je nakon predtretmana HVED pri parametrima ulazne energije od 66 kJ/kg i pH od 2,5 uslijedila ekstrakcija u 49 %-tnom etanolu. Navedeni predtretman s maksimalnom primijenjenim naponom od 40 kV pokazao se optimalnim u pogledu prinosa ukupnih proteina (0,225

mg/mL).

Osim u ekstrakcijske svrhe, hladna plazma koja se proizvodi tijekom HVED tretmana komercijalno se koristi za sterilizaciju i dezinfekciju površina, pri čemu učinkovito inaktivira veliki broj mikroorganizama, uključujući spore i viruse (Thirumdas i sur., 2015). HVED se također koristi kao tretman za pročišćavanje otpadnih voda, odnosno eliminaciju/mineralizaciju organskih tvari i patogenih bakterija (Zeghioud i sur., 2020). Hladna plazma efektivno degradira mikotoksine i inaktivira gljive koje proizvode mikotoksine u raznim namirnicama (Gavahian i Cullen, 2019).

2.3.2.3. Prednosti i nedostatci HVED ekstrakcije

U usporedbi s konvencionalnom ekstrakcijom, ali i s drugim netoplinskim tehnikama ekstrakcije, HVED ekstrakcija ima mnoge prednosti. Povećava prinos ekstrakcije, skraćuje vrijeme ekstrakcije i smanjuje potrebu za energijom kao posljedicu izuzetno visoke efikasnosti oštećivanja stanične membrane. Također smanjuje količinu potrebnog otapala za provođenje ekstrakcije. Netoplinska je metoda, što znači da je operativna temperatura niska i povećanje temperature uslijed tretmana minimalno. Upravo ova prednost omogućava smanjenje operativnih troškova ekstrakcije. Povećava antioksidacijsku aktivnost ekstrahiranih tvari, zbog čega se smatra tehnikom s velikim potencijalom za ekstrakciju bioaktivnih tvari (Puertolas i Barba, 2016).

Ipak, bitno je istaknuti izazove i nedostatke koje se treba riješiti. Prilikom pražnjenja, dolazi do stvaranja velikog broja slobodnih radikala, što posljedično može uzrokovati oksidativne promjene na stanici, ali i oksidaciju ciljanih tvari, smanjujući prinos ekstrakcije. Nema visoku selektivnost, već oštećenjem stanične membrane ili stijenke dovodi do oslobađanja unutarstaničnih sastojaka (Puertolas i Barba, 2016). Može uzorkovati narušavanje koloidne stabilnosti (Rocha i sur., 2018) i ima visoke troškove održavanja i servisa (Tena i Asuero, 2022).

2.3.3. Fenolna ekstrakcija

Ekstrakcija proteina iz biljnih tkiva otežana je zbog prisustva drugih tvari poput fenolnih spojeva, tilakoidnih fragmenata s klorofilom, polisaharida i lipida (Di Stefano i sur., 2018; Faurobert i sur., 2007). Fenolni spojevi stupaju u interakciju s proteinima putem vodikovih veza, ionskih i hidrofobnih interakcija te kovalentnim, koordinatnim vezama. Zbog navedenih interakcija, proteini postaju hidrofobniji, što ih čini podložnijim agregaciji i precipitaciji, ovisno o strukturi fenolne tvari (Vidović i sur., 2020). Proteomička istraživanja na listovima često provode osnovni korak precipitacije proteina s trikloroocetnom kiselinom (TCA) i

acetonom (Saravanan i Rose, 2004). Alternativni postupak je postupak fenolne ekstrakcije proteina pri čemu se proteini otapaju u fenolu, s ili bez natrijeva dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulphate*, *SDS*), nakon čega se precipitiraju s metanolom i amonijevim acetatom (Saravanan i Rose, 2004). Fenolna ekstrakcija uklanja neproteinske tvari i omogućava učinkovitu ekstrakciju proteina (Faurobert i sur., 2007). Fenolna ekstrakcija bazira se na djelovanju fenola na disocijaciju interferirajućih tvari i proteina, sprečavajući moguću agregaciju interferirajućih tvari i proteina (Vidović i sur., 2020). Uključuje ekstrakciju proteina u ekstrakcijskom puferu s dodanim protektivnim tvarima te saharozom koja podešava gustoću otopine i kalijevim kloridom zbog poboljšavanja topljivosti proteina u otapalu. Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) kelatna je tvar koja inhibira metaloproteinaze i polifenol oksidaze kelacijom. Fenil metil sulfonil fluorida (PMSF) ireverzibilno inhibira serin proteaze. Reducens β -merkaptotanol sprečava oksidaciju proteina. Proteini prelaze iz ekstrakcijskog pufera i otapaju se u fenolnom puferu. Fenolni pufer sadrži fenol – najjednostavniji aromatski alkohol koji primarno vodikovim vezama denaturira proteine da postanu topljivi u organskom otapalu. Prelazak nukleinskih kiselina, s membranskim proteinima i proteinima citoplazme, sprečava se podešavanjem pH vrijednosti pufera za ekstrakciju (Faurobert i sur., 2007). Proteini se iz fenolnog pufera precipitiraju dodatkom metanola (Saravanan i Rose, 2004).

Kada je fenolna ekstrakcija optimizirana, omogućava relativno visok prinos proteina te je najučinkovitija za uklanjanje interferirajućih tvari i rezultira gelovima najviše kvalitete (Vidović i sur., 2020; Carpentier i sur., 2005). Dobra rezolucija i smanjenje pozadinskog šuma u 2-D elektroforezi posljedica je efikasnog uklanjanja nukleinskih kiselina (Faurobert i sur., 2007). Prema Saravanan i Rose (2004) fenolna ekstrakcija rezultira najvećim prinosom proteina i vrlo je učinkovita za biljna tkiva s mnogo polisaharida i polifenola. Mane fenolne ekstrakcije uključuju dugotrajnost protokola metode i uporabu toksičnih tvari: metanola, fenola, PMSF i β -merkaptotanol (Faurobert i sur., 2007).

2.4. KVANTITATIVNO I KVALITATIVNO ODREĐIVANJE RUBISCO ENZIMA

2.4.1. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Metoda po Bradfordu prihvatljivija je od metode po Lowry-ju i biuret metode, koje su bazirane na kvantifikaciji fenolnih spojeva, za određivanje koncentracije proteina u biljnim uzorcima (Faurobert i sur., 2007). Metodom po Bradfordu može se odrediti koncentracija proteina koja proizlazi iz vezanja *Coomassie brilliant blue G-250* (CBB G-250) boje na

protein, rezultirajući kompleksom boja-protein pri čemu dolazi do pomaka apsorpcijskog maksimuma boje s 465 nm na 595 nm (Chang-Hui, 2019). CBB G-250 mijenja se iz forme u kojoj je crveno obojana u formu koja plave boje. Upravo je 595 nm valna duljina pri kojoj se određuje intenzitet plave boje koja nastaje reakcijom boje s primarno argininskim, a u manjoj mjeri s lizinskim, histidinskim, tirozinskim, triptofanskim i fenilalaninskim aminokiselinskim ostacima (Balen i sur., 2011). Koncentracija proteina određuje se iz baždarnog pravca pripremljenih otopina standarada poput albumina goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) kojima je, nakon vezanja CBB G-250, izmjerena apsorbanca pri 595 nm. Metoda po Bradfordu ima dobru reproducibilnost, brzu reakciju vezanja boje (oko 2 minute), stabilnost boje (tijekom sat vremena) te je jednostavna za izvođenje (Chang-Hui, 2019; Bradford, 1976). Moguća je interferencija ukoliko su u otopini proteina prisutne visoke koncentracije SDS, Triton X-100 i komercijalnih detergenta za staklo (Balen i sur., 2011) te zbog povećanja pH vrijednosti zbog dodatka natrijeve lužine (Chang-Hui, 2019). Problem može nastati kod previsoke koncentracije proteina pri čemu može doći do taloženja kompleksa boja-protein te je potrebno napraviti razrjeđenja otopine proteina. Uzorak proteina koji je kompleksirao s bojom nije moguće odrediti ponovno drugim metodama jer dolazi do denaturacije proteina (Chang-Hui, 2019; Bradford, 1976).

2.4.2. Western blot metoda

Western blot ima značajnu primjenu u biokemiji i ostalim prirodnim znanostima. Western blot metoda prilagođena je prijenosu i detekciji proteina, a nastala je modifikacijom metode Southern blot, prilagođene deoksiribonukleinskim kiselinama, i Northern blot, prilagođene ribonukleinskim kiselinama (Kurien i Scofield, 2006; Burnette, 1987). Prijenos proteina razdvojenih SDS elektroforezom na poliakrilamidnome gelu (SDS-PAGE) s gela na površinu nosača korisna je metoda za detekciju i karakterizaciju velikog obujma proteina, čak i proteina prisutnih u niskim koncentracijama (Kurien i Scofield, 2006). Dovoljno je osjetljiva za vizualizaciju specifičnih proteina u kompleksnoj smjesi antigena. Prijenos proteina s gela na nosač rezultira točnom replikom proteina u gelu i početni je korak za mnoštvo eksperimenata. Vezanje antitijela s proteinima na nitroceluloznoj membrani revolucionarizirali su polje imunologije (Kurien i Scofield, 2006). Metoda uključuje: pripremu uzoraka za SDS-PAGE i SDS-PAGE elektroforezu, elektroprijenos te imunodetekciju (Balen i sur., 2011; Burnette, 1987).

2.4.2.1. SDS elektroforeza

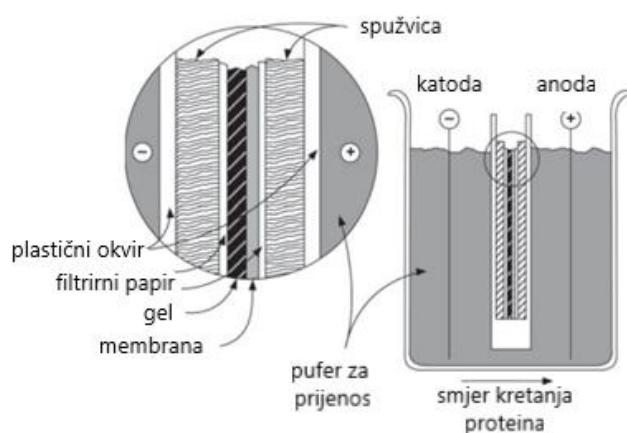
Elektroforeza je pojam koji označava putovanje, odnosno migraciju električki nabijenih

čestica kroz otopinu u električnom polju, pri čemu se analitički podatak utvrđuje prema razdiobi analiziranih čestica između elektroda (Piljac, 2006). Pokretljivost ovisi o jakosti električnog polja, o uvjetima u okolini (ionskoj jakosti, viskoznosti i temperaturi) i svojstvima same čestice (neto naboj, veličina, oblik) (Balen i sur., 2011). Kako bi se omogućilo elektroforetsko razdvajanje netopljivih i lako agregirajućih uzoraka potrebno je dodati odgovarajuće agense kao što su agensi za razaranje disulfidnih mostova, urea ili detergentsi. SDS anionski je detergent koji omogućuje oligomernim proteinima da se otope, dislociraju i denaturiraju na podjedinice (Balen i sur., 2011). Djelovanjem SDS na proteine nastaju kompleksne strukture koje imaju istu gustoću električnog (negativnog naboja) (Gallagher, 2012). Zbog toga omogućuje razdvajanje polipeptidnih lanaca ovisno o molekularnoj masi (Balen i sur., 2011). Pri tome se polipeptidni lanci tretirani SDS-om, prekriveni negativnim nabojem, kreću od anode prema katodi (Piljac, 2006). PAGE je naziv za provođenje elektroforeze u poliakrilamidnom gelu koji je karakterističan za elektroforetsko razdvajanje proteina. Poliakrilamidni gel proizvodi se polimerizacijskom reakcijom monomera akrilamida, pri čemu se unakrsno povezuju ko-monomeri *N*, *N'*-metilen-bis-akrilamida (A/Bis) uz dodatak katalizatora amonijeva persulfata (ASP) i *N,N,N',N'*-tetrametilendiamina (TEMED). Makromolekule iz analita prvo se sabijaju u tanki sloj u kraćem, nagomilavajućem (engl. *stacking*) (sabijajućem) gelu, a nakon toga ulaze u separacijski gel u kojem dolazi do razdvajanja (razdvajajući) (Moore, 2009). Ovaj postupak omogućava vrlo uske zone separacije proteina, što sprečava preklapanje različitih proteinskih molekula u analitu (Piljac, 2006). Osim poliakrilamidnih gelova, postoje i agarozni gelovi koji se primjenjuju za nukleinske kiseline ili za izoelektrično fokusiranje proteina (Balen i sur., 2011). SDS-PAGE omogućava određivanje molekulske mase proteina, a elektroforetska pokretljivost je obrnuto proporcionalna logaritmu molekulske mase proteina koji se razdvaja (Chang-Hui, 2019). Drugim riječima, pokretljivost ovisi o gustoći naboja, odnosno o omjeru naboja i mase (Balen i sur., 2011).

2.4.2.2. *Elektroprijenos proteina s gela na membranu*

Nakon provedene elektroforeze, proteine je u svrhu pružanja informacije o identitetu potrebno prenijeti na površinu tankog nosača. Nosači mogu biti razni tipovi membrana, od čega su najviše u primjeni nitrocelulozne membrane, poliviniliden difluoridne membrane (PVD), a manje diazo papiri (Balen i sur., 2011; Piljac, 2006). Učinkovitost i ubrzavanje prijenosa proteina na membranu povećava se primjenom električnog polja okomitog na ravninu gela (Moore, 2009). Takav prijenos naziva se „elektroprijenos“, a ovisno o primijenjenoj metodi

može biti „suhi“, „polusuhi“ i „mokri“. Mokri prijenos (engl. *wet blotting*) provodi se u uspravnoj kadici ispunjenoj puferom za prijenos, pri čemu su gel i membrana uronjeni u pufer te složeni u obliku „sendviča“ (slika 2) (Balen i sur., 2011; Goldman i sur., 2015). Važno je napomenuti kako negativno nabijeni proteini vezani za gel putuju od anode prema katodi, zbog čega dolazi do prijenosa s gela na membranu. Kod polusuhog prijenosa (engl. *semi-dry blotting*), gel je horizontalno nasložen na membranu, te se nalazi između dva, puferom namočena, filter papira i u izravnom je kontaktu s elektrodama (Balen i sur., 2011). Suhi prijenos (engl. *dry blotting*) novija je alternativa koja ne zahtijeva upotrebu pufera, a gel se umeće u unaprijed složenu strukturu koja sadrži membranu i stavlja u uređaj za elektro-prijenos, pri čemu zahtjeva manje vremena od druge dvije navedene metode (Goldman i sur., 2015).



Slika 2. Model sendviča kod mokrog prijenosa (lijevo) i prikaz kadice za prijenos (desno) (prema Goldman i sur., 2015)

2.3.2.3. Imunodetekcija proteina na membrani

Nakon prijenosa, ključno je zasiti područja membrane za koja nema vezanih proteina, što se naziva blokiranje jer se sprečava nespecifično vezanje primarnog antitijela na membranu ili proteine (Balen i sur., 2011). Nakon toga, slijedi indirektna ili direktna detekcija specifičnih proteina (antigena) na membrani vezanjem odgovarajućih visokospecifičnih protutijela. Protutijela mogu biti monoklonalna (identični imunoglobulini koji prepoznaju jedan epitop, specifičan dio antigena za koji se vežu) ili poliklonalna (smjesa protutijela koja prepoznaju različite specifične dijelove antigena) (Moore, 2009). Direktna detekcija se provodi vezanjem primarnog protutijela obilježenog detektabilnom molekulom (enzimom, biotinom, fluorescentnom bojom, radio-obilježenim proteinom A) bez upotrebe sekundarnog protutijela (Balen i sur., 2011; Moore, 2009; Kurien i Scofield, 2006). Indirektna detekcija zahtjeva vezanje sekundarnih protutijela na primarna protutijela, pri čemu su sekundarna protutijela

obilježena. Enzimi, najčešće alkalna fosfataza ili peroksidaza, reagiraju s dodatkom kromogenog (obojenje – kolorimetrijska reakcija) ili kemiluminiscencijskog supstrata (emisija svjetlosti – kemiluminiscencijska reakcija) i tako omogućavaju vidljivost područja na membrani na kojemu su vezani ciljani proteini. Ta područja se vide kao zatamnjene vrpce (Balen i sur., 2011).

2.5. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA S MASENOM SPEKTROMETRIJOM

Kromatografijom se odvajaju komplekse smjese sličnih komponenata pomoću brzine toka mobilne faze (u kojoj je prisutan analit) i interakcije komponenata u smjesi sa stacionarnom fazom (Robinson i sur., 2014). Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *ultra performance liquid chromatography, UPLC*) ima veću brzinu analize, bolju moć razdvajanja i bolju osjetljivost od tekućinske kromatografije, što se postiže novijim tehnologijama izrade kolona za kromatografiju (Tamošiūnas i Padarauskas, 2008). Komponente odvojene kromatografskom metodom uvode se u maseni spektrometar (MS) na detekciju putem spojnice (Robinson i sur., 2014). MS je tehnika kojom se molekule i atomi u uzorku ioniziraju, nakon čega se ioni odvajaju na temelju omjera mase i naboja, a mjeri se količina stvorenih iona. Spregnuta kromatografija s MS sustavom vrlo je moćna analitička tehnika. MS pruža kvalitativnu i kvantitativnu analizu, a često se koristi kao analitički alat za kvalitativnu identifikaciju i karakterizaciju različitih uzoraka (plina, tekućina i krutina) (Robinson i sur., 2014). Maseni analizator glavni je dio uređaja za MS i služi za diferencijaciju iona prema omjeru m/z (Anderson i Hunter, 2006). Kvadrupol maseni analizatori često se primjenjuju za kvantifikaciju malih molekula (Källsten i sur., 2019). Najčešće korišteni dvojni maseni spektrometar je trostruki kvadrupol (QQQ) u kojem su dva kvadrupola masni analizatori, dok treći predstavlja kolizijsku ćeliju. Prvi kvadrupol razdvaja ione u prekursorske ione (prva faza selekcije), zatim heksapol fragmentira te ione čiji se produkti fragmentacije dalje razdvajaju u drugom kvadrupolu (druga faza selekcije) (Agilent Technologies, 2012; Hoffmann, 1996). Metodom MRM postiže se mjerenje specifičnih peptida u kompleksnim smjesama, a temelji se na odabiru jednog iona-prekursora te dva ili više iona-produkata koji sudjeluju u fazama selekcije (Anderson i Hunter, 2006).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Listovi šećerne repe

Osušeni tamno-zeleni listovi šećerne repe, *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *altissima*, dobavljeni su od projektnih partnera Kayseri Şeker i Kocasinan Kayseri iz Turske.

3.1.2. Kemikalije i standardi

HVED ekstrakcija:

- argon (Messer Croatia Plin, Zaprešić, Hrvatska)
- dušik (Messer Croatia Plin, Zaprešić, Hrvatska)
- destilirana voda (PBF, Zagreb, Hrvatska)

Fenolna ekstrakcija

- polivinilpirolidon, PVP (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- miliQ voda (BIOCentar, Zagreb, Croatia)
- 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol, tris (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- saharoza, Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- kalijev klorid, KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- fenilmetilsulfonil fluorid, PMSF (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- etanol, 96 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- β-merkaptotanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- fenol (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- aceton (VWR Chemicals, Radnor, SAD)
- amonijev acetat (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 3-[(3-kolamidopropil)-dimetil-amonio]-1-propan sulfonat, CHAPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- urea (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- ditiotreitrol, DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- amfoliti (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- klorovodična kiselina, HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)

Metoda po Bradfordu:

- Coomassie Brilliant Blue G-250 boja (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- fosforna kiselina, H₃PO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)

- 1M trietilamonijev bikarbonat (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)

SDS PAGE

- *N, N, N, N*-tetrametiletildiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- amonijev persulfat, APS (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- akrilamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- *N, N'*-metilen-bis-akrilamida, A/Bis (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- natrijev dodecil sulfat (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- bromfenolplavo boja (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- ditiotreitol, DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- reH₂O (BIOCentar, Zagreb, Croatia)
- glicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- marker ColorBurst™ Electrophoresis Marker C1992-1VL (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)

Prijenos i imunodetekcija:

- natrijev hidrogenfosfat heptahidrat, Na₂HPO₄ x 7 H₂O (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- kalijev dihidrogenfosfat, KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- mlijeko u prahu (Dukat, Zagreb, Hrvatska)
- Tween 20[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Primarno antitijelo rabbit anti-RuBisCO large subunit AS03 037 (Agrisera, Vannas, Švedska)
- Sekundarno antitijelo goat anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase conjugated, AS09 602 (Agrisera, Vannas, Švedska)
- Reagens za kemiluminiscenciju ECL Bright AS16 ECL-N-10 (Agrisera, Vannas, Švedska)

Tekućinska kromatografija s masenom spektrometrijom

- acetonitril (VWR Chemicals, Radnor, USA)
- natrijev deoksikolat (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- trikloracetatna kiselina (Merck & Co., Rahway, SAD)
- acetone (VWR Chemicals, Radnor, SAD)
- metanska kiselina (VWR Chemicals, Radnor, SAD)
- tetrahidrofuran (*THF*) (J.T.Baker, Phillipsburg, SAD)

- albumin goveđeg seruma (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 1M trietil amonijev bikarbonat (*TEAB*) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- tris(2-karboksietil)fosfin hidroklorid (*TCEP*) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- jodoacetamid (*IAA*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- tripsin (Promega, Madison, SAD)
- Glu-C (Promega, Madison, SAD)
- TFQGPPHGIQVER (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- AQAETGEIK (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)

3.1.3. Priprema otopina

Za potrebe fenolne ekstrakcije potrebno je pripremiti sljedeće otopine:

i. Ekstrakcijski pufer (za 50 mL)

- 3,0825 g Tris
- 0,9306 g EDTA
- 11,9805 g saharoze
- 0,3728 g KCl
- Redestilirane vode (reH₂O) do 50 mL

Prije upotrebe dodati:

- 0,0037 g PMSF u 1 mL 96 %-tnog etanola
- 1 mL β-merkaptioetanola

ii. Fenolni pufer

- Zasićena otopina fenola u djelomično neutraliziranom Tris s klorovodičnom kiselinom (Tris-HCl), raspona pH 6,6 – 7,9

iii. Otopina za precipitaciju (100 mL)

- 0,77 g amonijevog acetata
- 100 ml metanola

iv. Pufer za izoelektrično fokusiranje (10 mL)

- 5 g uree
- 0,2 g CHAPS
- reH₂O do 10 mL
- Prije upotrebe dodati:

- a. 20 mg DTT
- b. 52,4 μ L amfolita

Za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu potrebno je pripremiti otopine:

- i. Bradford matična otopina (za 300 mL)
 - 0,350 g CBB G-250
 - 200 mL 88 %-tne H_3PO_4
 - 100 mL 95 %-tnog etanola
- ii. Bradford radna otopina (za 30 mL)
 - 30 mL Bradford matične otopine
 - 15 mL 96 %-tnog etanola
 - 30 mL 85 %-tne H_3PO_4
 - 25 mL + 400 mL destilirane vode (deH_2O)
- iii. Otopina BSA (10 mL)
 - 0,010 g BSA
 - 10 mL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera, pH 7,0.

Za SDS PAGE potrebno je pripremiti:

- i. Pufer za elektroforezu (12,5 mL)
 - 3,125 mL 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
 - 4 mL glicerol
 - 3,125 mL 20 %-tnog SDS
 - 1,25 mL β -merkaptetanol
 - 0,25 mL bromfenolplavo boja
 - 0,48 g DTT
 - reH_2O do 12,5 mL,
- ii. 10X elektrodni pufer (1 L), potrebno ga je prije uporabe razrijediti 10 puta
 - 30 g Tris,
 - 144 g glicin
 - 10 g SDS
 - 6,0 M HCl do pH 8,3
 - reH_2O do 1 L.

Tablica 1. Priprema gela za sabijanje i razdvajanje za SDS-PAGE (2 gela)

Naziv reagensa	Gel za sabijanje (4 %)	Gel za razdvajanje (10 %)
MiliQ voda	3,05 mL	4 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 mL	3,3 mL
30 % A/Bis	0,665 mL	4,0 mL
10 % SDS	50 μ L	100 μ L
10 % APS	35 μ L	50 μ L
TEMED	8 μ L	5 μ L

Za prijenos proteina s gela na membranu potrebno je pripremiti:

- i. pufer za prijenos (1 L)
 - 3,35 g Tris
 - 14,4 g glicin
 - 100 mL metanol
 - 6 M HCl do pH 8,3
 - deH₂O do 1 L.

Za imunodetekciju potrebno je pripremiti:

- i. 10 x puferiranu otopinu fosfatnih soli (1 L) (engl. *phosphate buffered saline, PBS*)
 - 80,00 g NaCl
 - 2,00 g KCl
 - 11,5 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O
 - 2,00 g KH₂PO₄
 - 6 M HCl do pH 7,4
 - reH₂O do 1 L,
- ii. pufer za blokiranje (250 mL)
 - 12,5 g mlijeka u prahu
 - 2,5 mL Tween 20®

- 25 mL 10 x PBS pufer
 - reH₂O do 250 mL,
- iii. pufer za ispiranje (100 mL)
- 1 mL 10 x PBS pufer
 - 100 µL Tween 20®
 - reH₂O do 100 mL.

3.1.4. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Generator hladne plazme, IMP-SSPG-1200 (Impel grupa, Zagreb, Hrvatska)
- Ultrazvučna kupelj DT 100 H 35 kHz (Bandelin, Berlin, Njemačka)
- Centrifuga, Centric 200R (Tehtnica, Otoki, Slovenija)
- Magnetna miješalica
- Tresilica
- Vorteks (IKA, Staufen, Njemačka)
- Vaga, tip PM 4000 (Mettler Toledo, Columbus, SAD)
- Termoblok, Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Spektrofotometar Unicam UV4-100 (ATI, Greer, SAD)
- Sustav za elektroforezu Mini-Protean Tetra System (BioRad, Hercules, SAD)
- Vertikalni sustav za elektroprijenos Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, SAD)
- Uređaj za skeniranje gela Epson perfection V700 photo (Epson, Suwa, Japan)
- Uređaj za kemiluminiscenciju LI-COR C[®] Digit Blot scanner (LI-COR Biosciences – GmbH, Njemačka)
- Uređaj za LC/MS 1290 Infinity, Quad pump, 6460 Triple Quad (Agilent technologies, Santa Clara, SAD)

Pribor:

Stakleni pribor:

- čaše (50 mL, 100 mL, 250 mL)
- menzure (30 mL, 500 mL, 1 L)
- stakleni štapić
- staklene boce za reagense (1L)
- lijevak za filtriranje

- petrijevka
- široka posuda

Ostali pribor: automatske pipete, eppendorf tubice, igla *Hamilton*, falkonice, Büchnerov lijevak, filter papir (*Whatmann*), magneti, nitrocelulozna membrana (Cytiva Amersham™ Protran™ NC, veličina pora 0,2 μm), plastične kivete, plastična pinceta, patrona s ledom, stalak za epruvete, stalak za eppendorf tubice, štoperica, tarionik s tučkom.

3.2. METODE

Metode koje su opisane u ovome radu provedene su u sklopu multidisciplinarnog projekta PRIMA H2020 GA2032 FunTomP- Functionalized Tomato Products, pri čemu su dobiveni podatci opisani u ovome radu dio znanstvenih istraživanja Dukić i sur. (2022) te Dukić i sur. (2023).

3.2.1. Dizajn eksperimenta i statistička analiza podataka

Eksperiment kojim se bavi ovaj diplomski rad dizajniran je na platformi STATGRAPHICS Centurion (StatPoint Technologies, Inc, SAD), na kojoj se provela i statistička analiza parametara ekstrakata listova šećerne repe. Statistička analiza obuhvaćala je ispitivanje utječu li parametri ekstrakcije (primijenjena voltaža i vrijeme ekstrakcije) na koncentraciju ukupnih proteina. Nazivi uzoraka sastavljeni su prema tablici 2 s obzirom na sirovinu, način ekstrakcije te, kod HVED ekstrakcije, uvođenome plinu. Kao statistički značajni parametri ekstrakcije uzeti su oni čija je p-vrijednost < 0,05.

Tablica 2. Objašnjenje naziva uzoraka

Slovo	Objašnjenje
L	List šećerne repe
H	Uzorak je dobiven HVED ekstrakcijom
A	Prilikom ekstrakcije korišten je plin argon
N	Prilikom ekstrakcije korišten je plin dušik (engl. <i>nitrogen</i>)
D	Uzorak je dobiven topinskom ekstrakcijom suhih listova šećerne repe (engl. <i>dry</i>)
P	Uzorak je dobiven fenolnom ekstrakcijom (engl. <i>phenol extraction</i>) (kontrolni uzorak)

Osim oznaka slova, uzorci tretirani HVED ekstrakcijom označeni su numerički prema uvjetima ekstrakcije, odnosno primijenjenom naponu voltaži (20 – 25 kV) te vremenu tretiranja (3 – 9 min). Oznake 1 – 6 sastavljene su prema tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti ekstrakcije potpomognute hladnom plazmom za uzorke 1-6

naziv uzorka		napon (kV)	vrijeme (min)
LHA1	LHN1	25	6
LHA2	LHN2	20	6
LHA3	LHN3	20	9
LHA4	LHN4	25	9
LHA5	LHN5	20	3
LHA6	LHN6	25	3

Uzorci na kojima je provedena toplinska ekstrakcija nisu se razlikovali prema temperaturi ekstrakcije, već samo prema vremenu tretiranja (3 – 9 min), što je opisano u tablici 4. Rezultati toplinskog tretmana obrađeni su u programu Microsoft Office Excel 2010.

Tablica 4. Uvjeti toplinske ekstrakcije za uzorke

naziv uzorka	temperatura (°C)	vrijeme tretiranja (min)
LD0/3	60	3
LD0/6	60	6
LD0/9	60	9

3.2.2. Ekstrakcije lista šećerne repe

3.2.2.1. Ekstrakcija RuBisCO proteina potpomognuta plazmom

Ekstrakcija visokonaponskim električnim pražnjenjem provedena je na generatoru hladne plazme prema prethodno optimiziranim parametrima iz istraživanja Nutrizio i sur. (2020). Generator hladne plazme generira visoki napon, ionizirajući plin, pri čemu dolazi do formacije hladne plazme u uzorku (Dukić i sur., 2022). Reaktor generatora sadržava pripremljeni uzorak, uronjenu elektrodu s vrha i iglu s dna. Razmak između elektroda iznosio je 15 mm. Ekstrakcija se provodi uz upuhivanje argona i dušika kroz iglu protokom od 0,75 L/min, prema uvjetima prikazanim u tablici 3. Frekvencija se ne mijenja za različite uzorke i

iznosi 100 Hz. Trajanje pulseva iznosi 400 ns.

Priprema uzoraka sastoji se od dodavanja $1 \pm 0,001$ g suhih listova šećerne repe u reaktor s 50 mL destilirane vode pri sobnoj temperaturi. Nakon HVED ekstrakcije dobiveni ekstrakti listova šećerne repe filtriraju se kroz Büchnerov lijevak i analiziraju.

3.2.2.2. *Konvencionalna, toplinska ekstrakcija*

Toplinska ekstrakcija provedena je u ultrazvučnoj kupelji napunjenoj vodom, bez upotrebe ultrazvuka. Uzorci su pripremljeni dodavanjem $2 \pm 0,1000$ g smrvljenih suhih listova u čašu od 250 mL i nadopunjavanjem sa 100 mL deionizirane vode, pri čemu su omjeri isti kao i u pripremi uzoraka za HVED ekstrakciju. Uzorci se stavljaju u zagrijanu kupelj, a temperatura prati termometrom. Kada temperatura uzoraka dostigne 60 °C, tretiraju se od 3 do 9 min, prema tablici 4. Nakon toplinske ekstrakcije dobiveni ekstrakti suhih listova šećerne repe filtriraju se kroz Büchnerov lijevak i analiziraju.

3.2.2.3. *Fenolna ekstrakcija*

Fenolna ekstrakcija napravljena je prema uputama Fauroberta i sur. (2007), uz manje preinake. Fenolna ekstrakcija započela je vaganjem 0,05 g suhih listova šećerne repe. Biljni materijal vrlo se dobro homogenizira u tarioniku s tučkom uz malu količinu PVP. Ekstrakcija se provede postupnim dodatkom 4 mL ekstrakcijskog pufera, uz vorteksiranje i inkubaciju na ledu. Važno je u ovom koraku temperaturu održavati ispod 4 °C. Nakon 10 minuta dodaje se isti volumen fenolnog pufera (4 mL) u digestoru, epruveta se vorteksira i inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi. Centrifugira se 15 minuta, pri 4 °C i 3900 g, pri čemu se fenolna faza izdvaja na vrh (supernatant). Fenolna faza sadržava citosolne i membranske proteine (Faurobert i sur., 2007). Fenolnu fazu pažljivo se odpipetira u novu falkonicu i doda se 4 mL ekstrakcijskog pufera uz inkubaciju na ledu u trajanju od 10 minuta. Otopine se centrifugiraju drugi put (15 minuta, pri 4 °C i 3900 g) nakon čega se supernatant pažljivo izdvoji i dodaje u novu epruvetu. U epruvetu se dodaje i oko 8 mL hladene (ledeno hladna) otopine za precipitaciju i ostavlja preko noći na -20 °C kako bi došlo do precipitacije proteina. Nakon precipitacije, sljedeći dan, uzorke se centrifugira 20 min, pri 4 °C i 4500 okretaja po minuti (engl. *revolutions per minute, rpm*). Supernatant se odbacuje, a dobiveni talog ispire 3 puta s hladenom otopinom za precipitaciju (4 mL) uz resuspendiranje pipetmanom i centrifugiranje između svakog ispiranja (10 min, pri 4 °C i 4500 rpm). Nakon toga se jednom ispire s 4 mL hladenog acetona. Isperen talog otopi se u 500 µL pufera za izoelektrično fokusiranje. Resuspenzija i trešnja na tresilici pomažu u otapanju. Otopljeni talog prebaci se u eppendorf

tubice volumena 1,5 mL i centrifugira 5 min pri 14 000 rpm te izdvojeni supernatant prebaci u novu eppendorf tubicu kako bi se odredila koncentracija proteina.

3.2.3. Kvantitativno i kvalitativno određivanje RuBisCO enzima

3.2.3.1. *Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu*

Matičnu otopinu može se čuvati na sobnoj temperaturi bez da se pokvari, dok je radna otopina stabilna nekoliko tjedana ako je zaštićena od svjetlosti, odnosno u tamnoj boci. Radna otopina priprema se dodatkom matične otopine u menzuru od 30 mL, a zatim se odmjereni volumen prenese u bocu. Menzura se ispire s etanolom, fosfornom kiselinom i destiliranom vodom, te se isto prenosi u bocu. Ostatak destilirane vode se odmjeri u menzuri od 500 mL i doda u bocu. Nakon pripreme radne otopine, potrebno ju je filtrirati.

Priprema baždarnog pravca

Iz pripremljene otopine BSA koncentracije 1 mg/mL napravi se serija razrjeđenja (0,1 – 1 mg/ml) dodavanjem 20 µL otopine proteina i 980 µL Bradford reagensa u dvije serije i izmjeri im se apsorbancija. Slijepa proba uključuje 20 µL otopine kalij-fosfatnog pufera i 980 µL Bradford radne otopine u dvije serije. Apsorbancije se pohrane u *software* spojen na spektrofotometar i automatski izradi baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina uzoraka BSA poznatih koncentracija. Iz baždarnog pravca automatski se očitaju koncentracije mjerenih uzoraka ekstrakata.

Određivanje koncentracije proteina u uzorcima ekstrakata

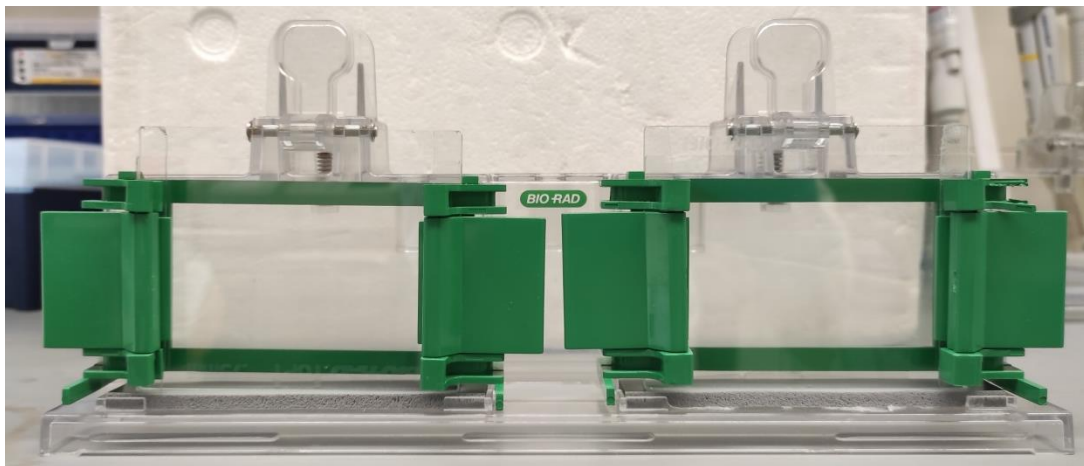
Za određivanje koncentracije proteina u uzorku dobivenom fenolnom ekstrakcijom uzeto je 20 µL fenolnog ekstrakta, odnosno supernatanta dobivenog postupkom opisanim u poglavlju 3.2.2.3., 10 µL 0,1 M HCl i 70 µL redesetilirane vode, uz dodatak 3,5 mL Bradford radne otopine u dvije serije. Slijepa proba umjesto uzorka sadrži 20 µL pufera za izoelektrično fokusiranje opisanog u pripremi otopina za fenolnu ekstrakciju. Nakon dodatka reagensa, pripremljeni uzorci se vorteksiraju i inkubiraju 10 minuta u mraku. U kivete se prenese 1 mL pripremljenih uzoraka i spektrofotometrijski se mjeri intenzitet obojenja koje je posljedica reakcije proteina s Bradfordovom otopinom na 595 nm.

Određivanje koncentracije proteina u uzorcima HVED ekstrakcije i toplinske ekstrakcije kreće dodavanjem 20 µL otopine proteina i 980 µL Bradford radne otopine u dvije serije u eppendorf epruvetu. Slijepa proba je 20 µL destilirane vode s 980 µL Bradford radne otopine. Nakon dodatka reagensa, uzorci u eppendorf tubicama su vorteksirani i inkubirani u mraku 10 minuta. Nakon inkubacije, sadržaj se iz eppendorf tubica se prenese u kivete i spektrofotometrijski mjeri intenzitet obojenja pri 595 nm.

Koncentracija proteina (mg/mL BSA) automatski se računa u programu prema baždarnoj krivulji te izražava po volumenu otopine standarda. Preračunava se u mg/g suhe tvari. Iz prijašnjih rezultata gravimetrijske metode određivanja suhe tvari u istom uzorku listova šećerne repe Dukić i sur. (2022) dobiven je udio suhe tvari.

3.2.3.2. SDS-PAGE elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

Potrebno je pripremiti sendvič od staklenih ploča koji dobro brtvi. Staklene ploče treba očistiti 96 %-tim etanolom, a brtvljenje složenog sendviča provjeri se ulijevanjem redistirane vode između staklenih ploča (slika 3). Prije ulijevanja gela potrebno je vodu izliti i posušiti stakla filter papirom.

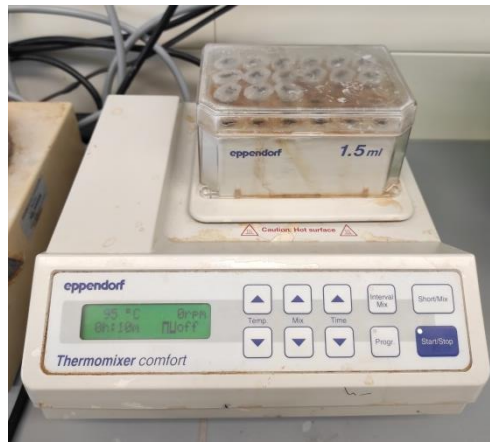


Slika 3. Prikaz elektrodnog nosača staklenih ploča (vlastita fotografija)

Sljedeće je potrebno pripremiti gelove za sabijanje i gelove za razdvajanje. Gelovi se pripremaju prema tablici 1. Kreće se sa pripremom gela za razdvajanje koji je na dnu. U čašu se dodaju svi sastojci osim TEMED. TEMED pokreće polimerizaciju i dodaje se na kraju, uz miješanje i homogenizaciju vrhom pipetmana. Prvo se ulije gel za razdvajanje i ostavi da polimerizira 45 minuta. Kako bi se spriječio pristup zraka gelu, dodaje se 20 %-tni etanol obojan 0,5 % bromfenolplavo bojom. Zatim se kreće s pripremom gela za sabijanje, koji dolazi iznad gela za razdvajanje, prema istim uputama. Prije nego se ulije gel za sabijanje, izlije se obojani etanol. U gel za sabijanje stave se češljici s jažicama i ostave da polimeriziraju 45 minuta. Nakon potpune polimerizacije gelova češljici se miču, a staklene ploče s gelovima se pričvrste na elektrodni nosač i između njih se dodaje svježi elektrodni pufer.

Uzorci za nanošenje na gel pripremaju se dodatkom 25 μ L modificiranog Laemlli pufera

(Laemlli, 1970) za elektroforezu i 100 μ L uzoraka ekstrakta proteina dobivenih HVED ekstrakcijom, toplinskom i fenolnom ekstrakcijom u eppendorf tubice. Uzorci se denaturiraju 10 minuta pri 95 °C na termobloku (slika 4).



Slika 4. Prikaz uzoraka na termobloku (vlastita fotografija)

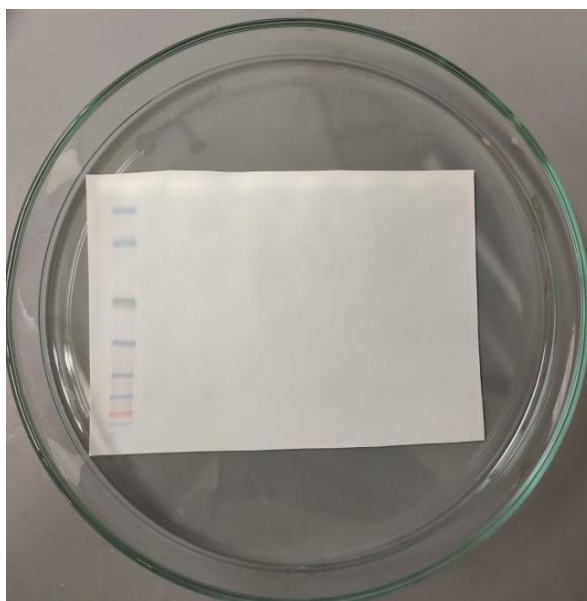
U jažice se dodaje volumen pripremljenog denaturiranog uzorka koji odgovara masi proteina od 3 μ g po jažici pomoću igle *Hamilton*. Marker za molekularnu masu nanosi se na prvu jažicu. Uzorke se mora nanijeti relativno brzo, a nakon nanošenja se staklene ploče na nosaču postavljaju u kadnicu s elektrodnim puferom. Elektroforezu se nakon spajanja elektroda i uključivanja izvora struje provodi pri 100 V 15 minuta, pri čemu uzorci putuju od gela za sabijanje do gela za razdvajanje (slika 5). Nakon toga se poveća napon na 190 V i elektroforeza se provodi do kraja, oko 60 minuta, odnosno dok fronta markera ne dođe do kraja gela. Po završetku elektroforeze, uređaj se isključi iz struje.



Slika 5. Prikaz SDS-PAGE elektroforeze (vlastita fotografija)

3.2.3.3. Prijenos proteina na membranu

Prijenos proteina s gela na nitroceluloznu membranu proveden je prema metodi za mokri prijenos opisan u Balen i sur. (2011). U širokoj stalkenoj posudi se namoče dijelovi potrebni za prijenos u puferu za prijenos, a nitrocelulozna membrana u redestiliranoj vodi (slika 6). Sendvič za prijenos se slaže između plastičnih okvira redom: spužvica, filtrirni papir, nitrocelulozna membrana, gel, filtrirni papir i spužvica. Plastični okviri se preklape i dobro učvrste, pazeći da nema mjehurića zraka. Crna strana okvira stavlja se na dno, odnosno membrana je na crnoj strani. Okvir se postavlja u kadicu za prijenos pazeći da je crna strana (membrana) okrenuta prema katodi, uz dodatak patrone s ledom koja sprečava povećanje temperature pufera za prijenos koji se nalazi u kadici. Prijenos traje 60 minuta pri naponu od 60 V.



Slika 6. Prikaz nitrocelulozne membrane nakon prijenosa (vlastita fotografija)

3.2.3.4. Analiza uzoraka Imunoblot metodom

Prvi korak imunodetekcije RuBisCO enzima je blokiranje membrane. Prije završetka prijenosa pripremi se pufer za blokiranje na magnetnoj miješalici, a prije blokiranja na membrani opcionalno označe biljezi grafitnom olovkom. Blokiranje membrane provodi se u petrijevki dodavanjem 30 mL pufera za blokiranje. Blokiranje se provodi 60 minuta na tresilici, a nakon toga se pufer izlije i membrana se inkubira u 20-ak mL otopine primarnog antitijela razrjeđenja 1 : 5 000, pripremljenog prema tablici 5 preko noći na 4 °C.

Tablica 5. Priprema otopina antitijela za imunodetekciju RuBisCO enzima

	Otopina primarnog antitijela	Otopina sekundarnog antitijela
antitijelo	4,0 μ L AS03 037 RbCl (Rubisco large subunit, from I, rabbit)	1,0 μ L AS09 602 goat anti-rabbit IgG (H8L), HRP conjugated
pufer za blokiranje	20 mL	20 mL
razrijeđenje	1 : 5000	1 : 20 000

Sljedeći dan se odbaci otopina i membrana ispere 3 puta po 10 minuta s 20 mL pufera za blokiranje na tresilici. Nakon toga se odbaci pufer za blokiranje, a membrana inkubira 60 minuta u 20-ak mL otopine sekundarnog antitijela razrijeđenja 1 : 20 000 na tresilici. Potrebno je opet isprati membranu, ovoga puta u puferu za ispiranje koji sadrži PBS i detergent *Tween*. Ispire se dva puta s 20 mL pripremljenog pufera po 10 minuta. Nakon toga se membrana, odnosno proteini za koje su vezana primarna i sekundarna antitijela obradi s 400 μ L po svake komponente otopine za kemiluminiscenciju ECL Bright, ukupno 800 μ L. Membrana se stavlja u mrak na 5 minuta kako bi se razvila luminiscencija i skenira na uređaju za kemiluminiscenciju, uz obradu slike.

3.2.3.5. Tekućinska kromatografija s masenom spektrometrijom

Priprema uzoraka za digestiju provedena je centrifugiranjem alikvota uzoraka LHA1 i LHN1 10 minuta, 10000 g pri 8 °C u Eppendorf tubicama od 1,5 mL. Supernatant je odvojen u novu Eppendorf tubicu i razrijeđen s MilliQ vodom kako bi se ujednačila koncentracija proteina. Uzeto je 0,30 mL supernatanta LHA1 uzorka i 0,70 mL vode, te 0,78 mL supernatanta LHN1 uzorka i 0,22 mL vode, u dvije paralele. U svaki uzorak dodan je interni standard, 10 μ L 1 mg/mL albumina goveđeg seruma te 12 μ L 10 %-tne otopine natrijevog deoksikolata i 179 μ L 50 % otopine trikloroctene kiseline. Nakon toga je uslijedila inkubacija na ledu u trajanju od 2 sata, a zatim se uzorke centrifugira pri istim uvjetima kao i u prvom centrifugiranju. Ovog puta se supernatant odbacuje, a talog ispire s 1 mL ledenog THF i centrifugira pri istim uvjetima, ponavljajući postupak ispiranja još jednom. Zatim se talog posuši i resuspendira u 50 μ L 50 mM TEAB te reducira s 2,5 μ L 200 mM TCEP pri sobnoj temperaturi u trajanju od 60 minuta. Nakon redukcije, uzorak se alkilira dodatkom 2,5 μ L 375 mM IAA u mraku pri sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta, a zatim se 2 sata taloži acetonom i centrifugira pri

istim uvjetima. Supernatant se odbacuje, a talog se posuši i resuspendira u 100 μ L 50 mM TEAB. Kod pripreme uzoraka za analizu koncentracije digestija se provela s tripsinom pri 37 $^{\circ}$ C i 600 rpm, a kod pripreme uzoraka za simulaciju matrice se digestija provodi s enzimom Glu-C u istim uvjetima. Nakon digestije se uzorci filtriraju kroz filter pora 0,2 μ m, alikvotiraju se i smrzavaju na -80 $^{\circ}$ C.

Kalibracijska krivulja raspona od 100 do 5000 ng/mL izrađena je tako da se u 27 μ L matrice dodaje 3 μ L radne otopine standardnih peptida (razrjeđenje peptida TFQGPPIHIQVER i AQAETGEIK u MilliQ vodi koncentracije 100000 ng/mL) te 30 μ L MilliQ vode. Matrica je prethodno pripremljena dodatkom 250 μ L odmrznutog alikvota uzorka, 250 μ L milliQ vode i 5 μ L albumina govedeg seruma kao internog standarda.

Kvantitativna analiza RuBisCO enzima LC/MS tehnikom MRM metodom na uređaju za LC/MS s trostrukim kvadrupolom kreće od razdvajanja uzorka tekućinskom kromatografijom. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 4 μ L. Tekućinska kromatografija provela se pri konstantnoj brzini mobile faze od 0,4 mL/min na kromatografskoj koloni Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2,1 x 150 mm (stacionarna faza). Mobilna faza sastojala se od 0,1 %-tne metanske kiseline u vodi (otopina A) i 0,1 %-tne metanske kiseline u acetonitrilu (otopina B). Vrijeme eluiranja postavljeno je na 15 minuta s gradijentom eluiranja prema tablici 6 pri temperaturi pećnice od 40 $^{\circ}$ C.

Tablica 6. Prikaz gradijentnog eluiranja uzorka u kromatografskoj koloni

Vrijeme eluiranja (min)	otopina A (%)	otopina B (%)
0-2	98	2
2-10	98 – 40	2 – 60
10-11	40 – 10	60 – 90
11-13	10	90
13-14	10 – 88	90 – 2
14-15	98	2

Masena spektrometrija započinje ionizacijom uzorka (eluata dobivenog kromatografijom) elektroraspršivanjem (engl. *electrospray ionization, ESI*) u pozitivnom načinu rada. Kapilarni napon iznosilo je 3,5 kV. Temperatura plina uzorka iznosila je 300 $^{\circ}$ C. Protok je bio 7 L/min,

a protok plina za formiranje maglice 9 L/min i temperature 300 °C. Tlak u nebulizatoru iznosio je 40 psi.

MRM metoda za kvantifikaciju je razvijena na platformi Skyline verzije 21.2.0.425, a sekvence RuBisCO su skinute s UniProt baze podataka. Odabrani su ciljani peptidi RuBisCO enzima AQAETGEIK i TFQGPPHGIQVER, od kojih je prvi peptid služio za kvantifikaciju, a drugi kao potvrda prisutnosti ciljanog proteina. Ostali peptidi koji mogu biti homologni aminokiselinskom slijedu peptida drugih proteina u uzorku eliminirani su korištenjem proteoma kultivara *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* kao pozadinskog proteoma. MRM metodom pratio se njihov nastanak i omogućila kvantifikacija RuBisCO enzima. Spektar je analiziran *software* programom MassHunter Workstation software (Agilent technologies, Santa Clara, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Eksperimentalni dio je proveden u cilju istraživanja kako parametri HVED ekstrakcije, točnije napon i vrijeme tretmana, utječu na ekstrakciju enzima RuBisCO iz listova šećerne repe. Eksperiment se sastojao od dvije grupe sa šest uzoraka. Grupe su se razlikovale prema uvođenom (radnome) plinu – argon ili dušik, a uzorci unutar grupe prema nezavisnim varijablama (primijenjen napon: 20 – 25 kV; vrijeme tretiranja: 3 – 9 min). Zavisna (mjerena) varijabla je koncentracija ukupnih proteina (mg/mL BSA). Parametri HVED ekstrakcije statistički su značajni ako je p vrijednost $< 0,05$, odnosno ako se s 95 %-tnom sigurnošću značajno razlikuju od 0.

Toplinska ekstrakcija obuhvaćala je jednu grupu uzoraka koji se razlikuju prema vremenu tretiranja (3 min, 6 min i 9 min), odnosno vrijeme tretmana je nezavisna varijabla. Zavisna varijabla je ista kao i kod HVED ekstrakcije.

Za ekstrakcijsko otapalo kod HVED i toplinske ekstrakcije odabrana je destilirana voda kao ekološki i tehnološki prihvatljivo otapalo (Dukić i sur., 2023).

Ekstrakt dobiven toplinskom ekstrakcijom listova šećerne repe negativna je kontrola za Western blot metodu s pretpostavkom da je RuBisCO enzim, odnosno velika podjedinica, denaturirana prilikom ekstrakcije.

Ekstrakt dobiven fenolnom ekstrakcijom pozitivna je kontrola za Western blot metodu, pri čemu se proteini maksimalno štite odvajanjem od fenolnih spojeva, integritet razvijenih vrpce na membrani poboljšava uklanjanjem nukleinskih kiselina tijekom ekstrakcije, a i tijekom čuvanja se proteini ne izlažu visokim temperaturama.

Koncentracija ukupnih proteina određena je metodom po Bradfordu u ekstraktima dobivenim HVED ekstrakcijom, ekstraktima dobivenim toplinskom ekstrakcijom i ekstraktu dobivenog fenolnom ekstrakcijom.

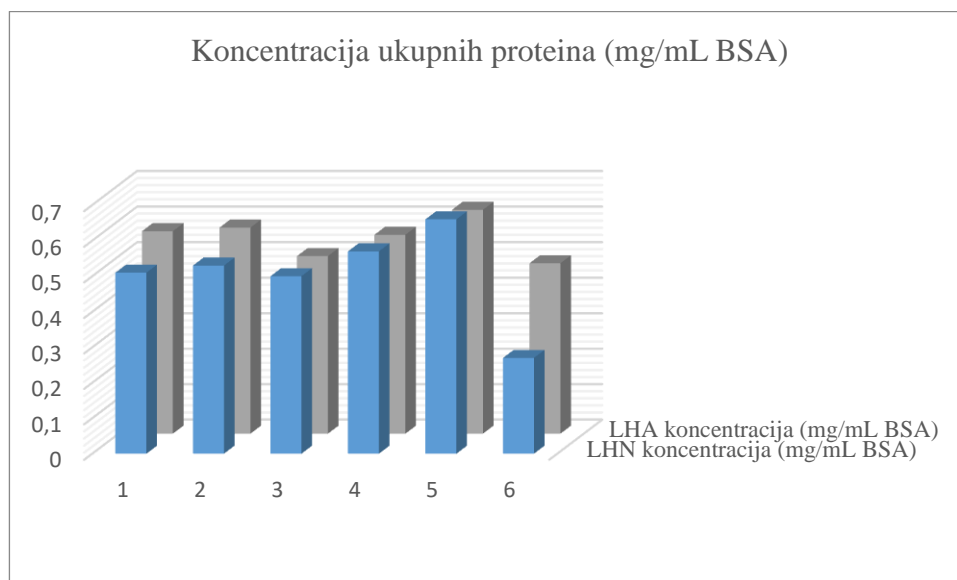
Kvantitativno-kvalitativna imunodetekcija RuBisCO enzima provjerena je Western blot metodom. Dodatna kvantifikacija dva uzorka koji su imali najizraženije vrpce na području velike podjedinice RuBisCO enzima temeljem Western Blot metode provela se metodom MRM na uređaju za razdvajanje tekućinskom kromatografijom spregnutom s masenom spektrometrijom.

Rezultati su nakon obrade u STATGRAPHICS Centurion i u programu Microsoft Office Excel 2010 prikazani u obliku tablica i slika u ovom poglavlju.

Koncentracija proteina je iz mase po volumenu otopine standarda (BSA) izražena kao masa po masi suhe tvari lista šećerne repe. Udio suhe tvari u listovima šećerne repe iznosio je $94,49 \pm 1,6 \%$ (Dukić i sur., 2022). Konačne koncentracije ukupnih proteina uzoraka dobivenih HVED ekstrakcijom prikazane su na slici 7 (mg/mL BSA) i navedene su u tablici 7 (mg/g s.t.). Bitno je istaknuti da su metodom određeni ukupni proteini, a ne samo RuBisCO.

Tablica 7. Prikaz koncentracija ukupnih proteina određenih metodom po Bradfordu izražene na suhu tvar listova

Naziv uzorka	Koncentracija proteina (mg / g s.t.)
LHA1	$26,44 \pm 1,59$
LHA2	$30,68 \pm 2,12$
LHA3	$26,43 \pm 1,59$
LHA4	$29,60 \pm 1,59$
LHA5	$33,33 \pm 1,06$
LHA6	$25,39 \pm 0,53$
LHN1	$26,97 \pm 1,06$
LHN2	$28,06 \pm 0,00$
LHN3	$26,43 \pm 2,11$
LHN4	$30,16 \pm 2,12$
LHN5	$34,90 \pm 1,59$
LHN6	$14,27 \pm 0,53$



Slika 7. Usporedba koncentracija ukupnih proteina u uzorcima LHA (siva boja stupaca) i LHN (plava boja stupaca) određena metodom po Bradfordu uz BSA kao standard

Prilikom određivanja koncentracije proteina i procesiranja listova, potrebno je razlučiti između korištenja cjelovitog lista s peteljkom ili samo lista. Koncentracija proteina u uzorcima viša je u slučaju procesiranja samo lista, bez peteljke (Tenorio i sur., 2016).

Statistička analiza provedena je analizom varijance s dvije nezavisne varijable (napon i vrijeme tretmana) i njihovim efektom interakcije – ANOVA. Rezultati analize prikazani su u tablici 8 za uzorke LHA1 – LHA6, te tablici 9 za uzorke LHN1 – LHN6. Statistička analiza provedena je uzimajući koncentracije ukupnih proteina izraženih kao mase po volumenu otopine standarda (BSA). Tablica ANOVA rastavlja učinke varijabla na zasebne dijelove i vrši testove statističke značajnosti svakog učinka. Testovi uspoređuju srednje vrijednosti kvadrata s procjenom ukupne pogreške. *P*-vrijednost je empirijska razina značajnosti, a nju se uspoređuje s teorijskom razinom značajnosti (α). U analizi je α određena na 5 %, odnosno 0,05. Prema tablicama 8 i 9, vidljivo je da su sve *p*-vrijednosti izvora veće od teorijske razine značajnosti, što indicira da niti nezavisne varijable niti njihove međusobne interakcije nemaju statistički značajan utjecaj na prinos ukupnih proteina.

Tablica 8. Statistička značajnost varijabli na vrijeme tretiranja i primijenjeni napon za uzorke LHA1 – LHA6

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>D_f</i> *	<i>Srednja vrijednost kvadrata</i>	<i>F-omjer</i>	<i>p-vrijednost</i>
A: napon	0,00166667	1	0,00166667	4,08	0,2926
B: vrijeme tretmana	0,000625	1	0,000625	1,53	0,4328
AB	0,011025	1	0,011025	27,00	0,1210
BB	0,00140833	1	0,00140833	3,45	0,3145
Ukupna pogreška	0,000408333	1	0,000408333		
Ukupna korekcija	0,0151333	5			

$R^2 = 97,3018\%$; $R^2_p = 86,5088\%$

* d_f – stupanj slobode u izvoru (engl. *the degrees of freedom in the source*)

R^2 statistika označava kako navedeni model objašnjava 97,3018 % varijabilnosti koncentracije ukupnih proteina za uzorke LHA1 – LHA6, odnosno 86,5088 % ako je prilagođen broj stupnjeva slobode u izvoru (R^2_p).

Tablica 9. Statistička značajnost varijabli na vrijeme tretiranja i primijenjeni napon za uzorke LHN1 – LHN6

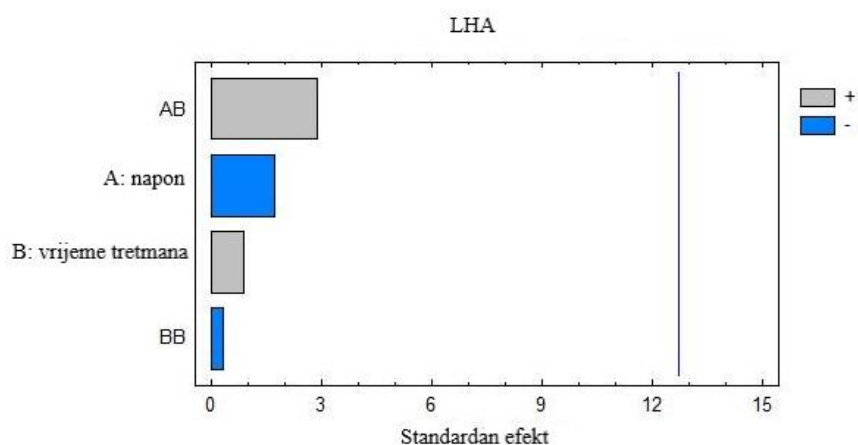
Izvor	Zbroj kvadrata	D_f^*	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost
A: napon	0,0192667	1	0,0192667	2,95	0,3357
B: vrijeme tretmana	0,0049	1	0,0049	0,75	0,5456
AB	0,0529	1	0,0529	8,10	0,2151
BB	0,000533333	1	0,000533333	0,08	0,8228
Ukupna pogreška	0,00653333	1	0,00653333		
Ukupna korekcija	0,0841333	5			

$$R^2 = 92,2345 \% ; R_p^2 = 61,1727 \%$$

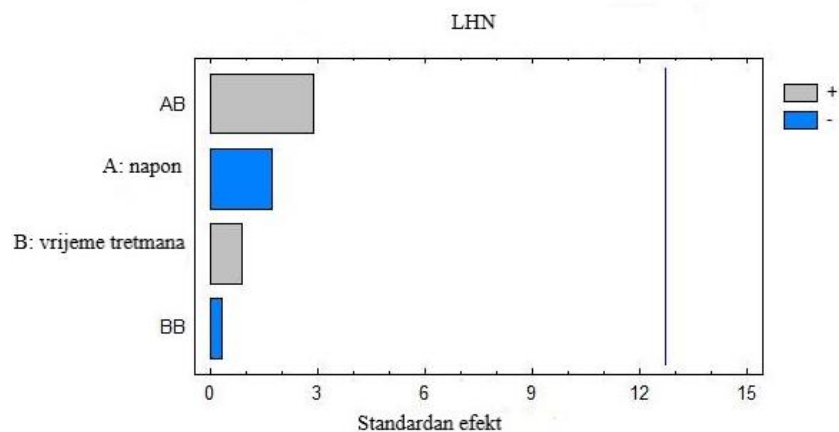
* d_f – stupanj slobode u izvoru (engl. *the degrees of freedom in the source*)

Za uzorke LHN1 – LHN6 navedeni model objašnjava 92,2345 % varijabilnosti koncentracije ukupnih proteina, odnosno 61,1727 % s prilagođenim brojem stupnjeva slobode u izvoru.

Sljedeće su prikazani Pareto dijagrami (slike 8 i 9) Na dijagramu su oni podatci statistički značajni koji se nalaze desno od plave linije. Prema slikama 8 i 9 vidljivo je da napon i vrijeme tretmana nemaju statistički značajan utjecaj, što je u sukladnosti s ANOVA tablicama (tablice 8 i 9).

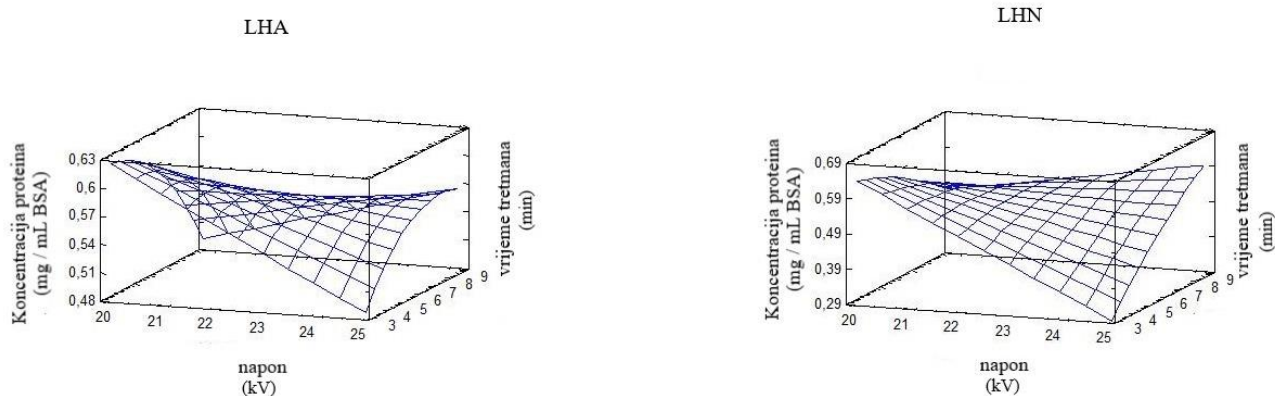


Slika 8. Pareto dijagram za ukupne proteine u uzorcima dobivenim HVED ekstrakcijom s uvođenjem argona



Slika 9. Pareto dijagram za ukupne proteine u uzorcima dobivenim HVED ekstrakcijom s uvođenjem dušika

Procjena površine odziva za obje grupe (slika 10) prikazuje utjecaj napona i vremena tretmana na koncentraciju proteina. Na slici 10, lijevo, vidi se da najviši prinos proteina ima uzorak LHA5 (0,63 mg/mL BSA), te desno na slici da je najviši prinos kod uzorka LHN5 (0,66 mg/mL BSA). HVED ekstrakcija, bez obzira na uvođeni plin (argon ili dušik), ima zabilježene najviše prinose proteina pri naponu od 20 kV i vremenu tretmana od 3 minute.



Slika 10. Procjena površine odziva za uzorke dobivene HVED ekstrakcijom s uvođenjem argona (lijevo) i dušika (desno)

S obzirom na provedenu statističku analizu dobiven je polinom optimizacije za HVED ekstrakciju s upuhivanjem argona i dušika te je izračunata optimalna koncentracija proteina (tablica 10). Optimizacija je provedena s ciljem maksimiziranja prinosa proteina.

Tablica 10. Optimizacija parametra napona i vrijeme tretiranja za HVED ekstrakciju

Polinom optimizacije za HVED tretman s upuhivanjem argona	Optimalan odziv			
Koncentracija proteina (mg/mL BSA) = 1,565 - 0,0486667 * napon - 0,118333 * vrijeme tretmana + 0,007 * napon * vrijeme tretmana - 0,00361111 * vrijeme tretmana ²	<i>Faktor</i>	<i>Nizak</i>	<i>Visok</i>	<i>Optimalan</i>
	Napon (kV)	20,0	25,0	20,0
	Vrijeme tretmana (min)	3,0	9,0	3,0
	Optimalna koncentracija proteina 0,624167 mg/mL BSA			
Polinom optimizacije za HVED tretman s upuhivanjem argona	Optimalan odziv			
Koncentracija proteina (mg/mL BSA) = 2,95 - 0,114667 * napon - 0,306667 * vrijeme tretmana + 0,0153333 * napon * vrijeme tretmana - 0,00222222 * vrijeme tretmana ²	<i>Faktor</i>	<i>Nizak</i>	<i>Visok</i>	<i>Optimalan</i>
	Napon (kV)	20,0	25,0	20,0
	Vrijeme tretmana (min=	3,0	9,0	3,0
	Optimalna koncentracija proteina 0,636667 mg/mL BSA			

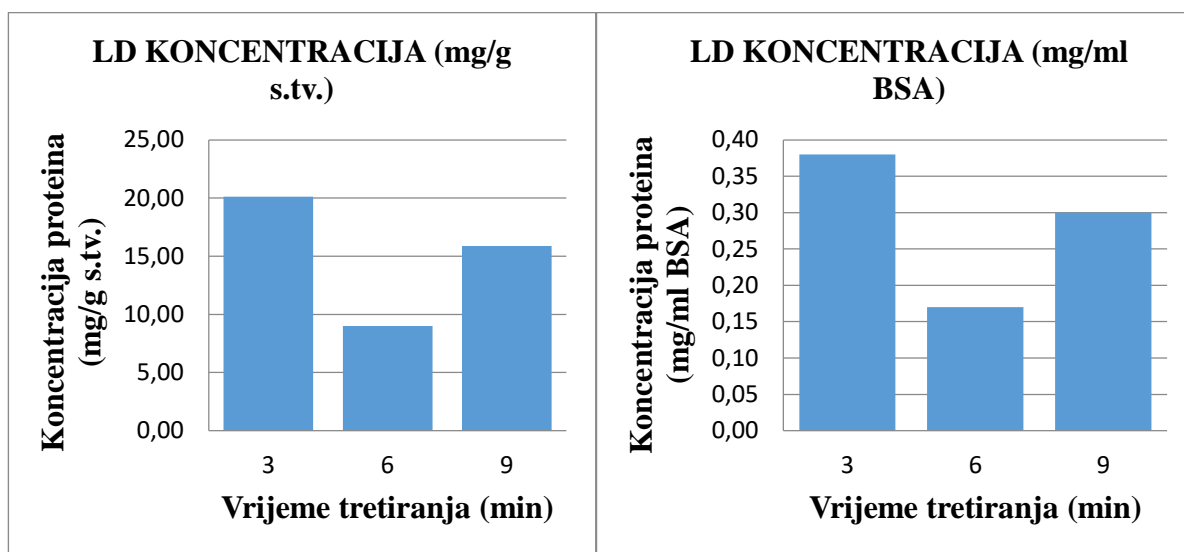
Iz dobivenih polinoma optimizacije, vidljivo je da pri istim uvjetima: napon 20 kV i vrijeme tretmana 3 min, optimalna koncentracija proteina dobivenih ekstrakcijom uz upotrebu dušika iznosi 0,637 mg/mL BSA, što je više od optimalne koncentracije dobivene uz upuhivanje argona – 0,624 mg/mL BSA.

Usporedba prinosa HVED ekstrakcije s ekstrakcijom provedenom prema Martin i sur. (2019) ukazuje da je HVED ekstrakcija pri uvjetima opisanim u ovom radu manje efikasna. Martin i sur. (2019) izolirali su 50 g RuBisCO proteina iz 15,2 kg listova šećerne repe. Početni biljni materijal listova imao je 128 g proteina/kg s.tv., dok je pročišćeni i osušeni preparat imao 846 g proteina/kg s.t. Koncentracija proteina određena je metodom po Kjeldahlu, a izolacija i pročišćavanje provedene su cijedenjem svježih listova šećerne repe bez stabljika (12,5 kg) u čiji je sok dodan natrijev metabisulfit i kalcijev klorid dihidrat, uz namještanje pH vrijednosti na 6,8. Sok je zagrijavan na 50 °C, te centrifugiran kako bi se uklonio talog (klorofil), a zatim je supernatant ultrafiltriran. Permeat (koncentrirana otopina proteina) pročišćena je dijafiltracijom s natrijevim metabisulfitom i demineraliziranom vodom. Time je dobiveno 1 L izolata RuBisCO proteina koji je osušen smrzavanjem. U usporedu s LHN5 uzorkom koji ima $34,90 \pm 1,59$ mg proteina/g s.t., odnosno g proteina/kg s.t., vidimo da HVED ekstrakcija ima znatno niži prinos nego ekstrakcije provedena prema Martinu i sur. (2019) kojom je dobiven proteinski izolat s 846 g proteina/kg s.t. Bitno je naglasiti da je provedena HVED ekstrakcija puno jednostavnija, ima manje koraka i zahtijeva manje energije i otapala. Također, uzorci za HVED ekstrakciju nisu koncentrirani kao u istraživanju Martin i sur. Metoda određivanja ukupnih proteina također nije ista, što dodatno utječe na mogućnost uspoređivanja. Iz ovog istraživanja može se vidjeti kako izolacija i koncentriranje RuBisCO proteina može dovesti do dobivanja izolata od 84,6 % proteina/kg suhe tvari listova šećerne repe (Martin i sur., 2019). Stoga se može zaključiti da je daljnje povećanje koncentracije proteina iz ekstrakta dobivenih HVED ekstrakcijom moguće uz bolju optimizaciju parametara, koncentriranje ili spregom HVED ekstrakcije s nekom drugom tehnikom ekstrakcije. Poboljšavanje ekstrakcije postiže se optimizacijom parametara. Optimalni parametri za provedeno istraživanje u sklopu ovoga rada su napon 20 kV i vrijeme tretmana 3 min.

Napon i vrijeme tretmana provedenog u sklopu istraživanja ovog diplomskog rada nisu imali statistički značajan utjecaj na ekstrakciju ukupnih proteina iz listova šećerne repe, dok pri istraživanju Roselló-Soto uvjeti HVED tretmana i ulazna energija imaju statistički značajan utjecaj na ekstrakciju ukupnih proteina iz koštica maslina ($p < 0,05$). HVED tretman koštica maslina je opisan u poglavlju 2.3.2.2., te je prikazano da HVED tretman ima veću efikasnost vremena tretmana i ulazne energije u usporedbi s tretmanom ultrazvukom i pulsirajućim električnim poljem (Roselló-Soto i sur., 2014).

Konvencionalna ekstrakcija provedena je u svrhu negativne kontrole za Western blot metodu, a rezultati određivanja ukupnih proteina prikazani su na slici 11. Dva grafa prikazuju ovisnost

zavisne varijable (koncentracije proteina) o jednoj nezavisnoj varijabli – vremenu tretiranja. Rezultati su kao i kod rezultata HVED ekstrakcije izraženi kao mg/mL BSA (desno) i mg/g s.tv. (lijevo).



Slika 11. Stupčasti graf prikazuje koncentraciju toplinski tretiranih uzoraka u ovisnosti o vremenu tretiranja (3 min, 6 min i 9 min) izraženu kao mg proteina/g suhe tvari (lijevo) i mg proteina/mL albumina govedjeg seruma (standard)

Provedena je analiza varijance s jednim promjenjivim faktorom (engl. *One-Way ANOVA*) kako bi se analizirao utjecaj vremena tretiranja na koncentraciju ukupnih proteina u uzorcima (tablica 11). Analiza je pokazala da vrijeme tretmana ima statističku značajnost, odnosno da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji proteina između grupa tretiranih uzoraka (3 min, 6 min i 9 min) ($F(1,4) = 10,880$, $p = 0,030$). Dodatna potvrda je kritična F vrijednost koja je manja od F vrijednosti ($7,709 < 10,880$).

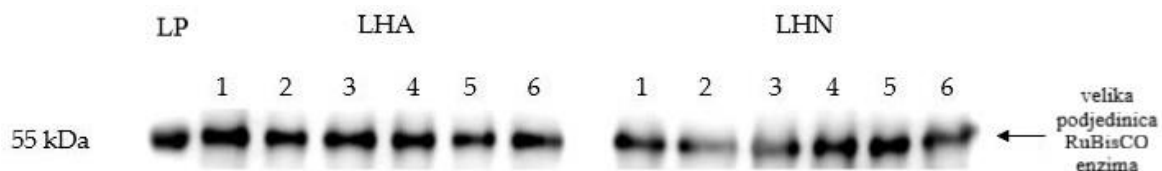
Tablica 11. ANOVA za toplinski tretirane uzorke

<i>Izvor varijacije</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Stupanj slobode</i>	<i>Kvadrat medijana</i>	<i>F vrijednost</i>	<i>p vrijednost</i>	<i>Kritična F vrijednost</i>
Između grupa	49,020	1	49,020	10,880	0,030	7,709
Unutar grupa	18,022	4	4,506			
Ukupno	67,043	5				

RuBisCO iz lista šećerne repe, s obzirom na to da je šećerna repa viša biljka, prisutan je u organizacijskoj strukturi I (Andersson i Backlund, 2008). Struktura I ima osam velikih podjedinica i osam malih podjedinica (Barbeau i Kinsella, 1988). Katalitička podjedinica molekulske je mase oko 55 kDa, a manja podjedinica oko 12,5 kDa (Lamsal i sur., 2007; Andersson i Backlund, 2008).

SDS-PAGE analize uzoraka listova šećerne repe provedene su u istraživanjima Martin i sur. (2019) i Tenorio i sur. (2016). U prvome istraživanju navedene su dvije glavne vrpce, pri 12,5 kDa i 55,0 kDa, koje označavaju prisutnosti male i velike podjedinice (Martin i sur., 2019). Prema Tenorio i sur. (2016), vrpce su se nalazile pri 14 kDa i 53 kDa, isto tako označavajući malu i veliku podjedinicu.

S obzirom na to, intenzitet vrpce pri 55 kDa koja je razvijena Western blot metodom u sklopu ovoga rada odgovara koncentraciji velike podjedinice. Koncentracija velike podjedinice proporcionalna je koncentraciji multimernog enzima RuBisCO, stoga je moguće uspoređivati jačinu vrpce na istoj membrani u svrhu procjene koji uzorak ima višu koncentraciju RuBisCO enzima. Nije moguće direktno usporediti vrpce koje se ne nalaze na istoj membrani jer je takva usporedba neprecizna. Tijekom imunodetekcije veliki je broj faktora koji imaju utjecaj na vezanje antitijela i razvijanje vrpce.

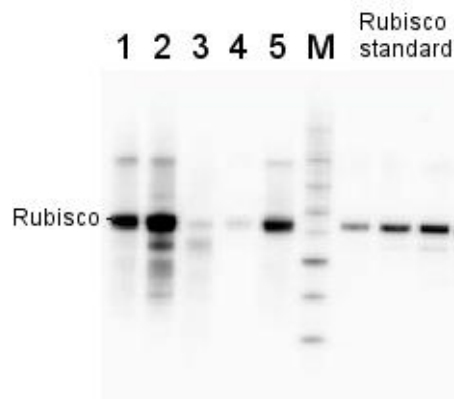


Slika 12. Sken imunodetekcije RuBisCO enzima na membrani (prema Dukić i sur., 2023)

Detektirane vrpce nalaze se u području molekulske mase od 55 kDa (slika 12). Molekulska masa obilježena je markerom ColorBurst™ Electrophoresis Marker C1992-1VL. Područje od 55 kDa očekivano je područje na membrani s najizraženijim vrpcama, jer se očekuje da će RuBisCO biti najzastupljeniji u ukupnim proteinima. Ciljano je detektirana velika podjedinica RuBisCO enzima, koja je proporcionalna s udjelom RuBisCO enzima.

Vrpce imaju šum oko sebe, što može biti posljedica neadekvatnog pročišćavanja i denaturacije proteina. Vidljivo je kako je kod kontrolnog uzorka LP (fenolne ekstrakcije) vrpca pri 55 kDa puno preciznija. Dobra rezolucija i smanjenje pozadinskog šuma u 2-D

elektroforezi prema Faurobert i sur. (2007) može biti rezultat efikasnog uklanjanja nukleinskih kiselina.

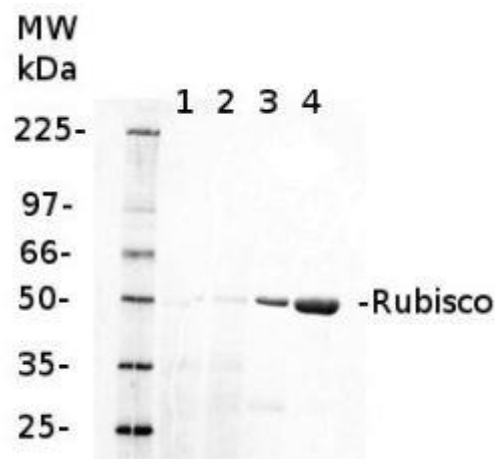


Slika 13. Kvantifikacija RuBisCO enzima dobivenih iz različitih biljnih ekstrakata usporedbom jačine intenziteta vrpce (prema Agrisera, 2023)

Na slici 13 prikazan je primjer kvantifikacije koncentracije RuBisCO enzima iz 2 μg ukupnih proteina dobivenih iz različitih biljnih ekstrakata (1 – 5). M oznaka označuje marker MagicMarks (Invitrogen). Kako bi se omogućila usporedba jačine intenziteta vrpce u tri jažice dodan je Rubisco standard (AS01 017S) u množinama od 0,0625 pmol, 0,125 pmol i 0,25 pmol, a imunodetekcija provedena primarnim antitijelom rabbit anti-RuBisCO large subunit AS03 037 (Agrisera, Vannas, Švedska) i sekundarnim antitijelom goat anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase conjugated, AS09 602 (Agrisera, Vannas, Švedska). Upotrebom Quantity One *software* (Bio-Rad) omogućena je kvantifikacija uzoraka 1 – 5. Alat za konturiranje koristi površinu kako bi procijenio količinu velike podjedinice RuBisCO enzima za uzorke i standarde (Agrisera, 2023).

Naglašeno je kako se optimalna kvantifikacija postiže umjerenim nanošenjem količine ukupnih proteina u jažice, u pravilu oko 0,5 do 2,5 μg , s obzirom na udio ciljanog proteina (RuBisCO enzima) (Agrisera, 2023). U provedenom eksperimentu u sklopu ovog diplomskog rada, nanoseno je 3 μg po jažici, što je iznad gornje granice preporuke proizvođača Agrisera. Zbog različitih raspona koncentracija ukupnih proteina u uzorcima 3 μg po jažici bila je odgovarajuća masa proteina, odnosno optimalan volumen uzorka uzet za SDS-PAGE i kasnije imunodetekciju.

Jasno je potvrđeno na slici 13 da je s povećanjem koncentracije RuBisCO enzima vrpca jače izražena, odnosno tamnija.



Slika 14. Prikaz skena imunodetekcije RuBisCO enzima iz uzoraka kolorifila algi *Cryptophyte* (1, 2), klorofila iz listova *Arabidopsis thaliana* (3) te ukupnih proteina iz ekstrakta listova *Arabidopsis thaliana* (Agrisera, 2023)

Molekulska masa vrpce velike podjedinice RuBisCO enzima dobivenog imunodetekcijom primarnim antitijelom rabbit anti-RuBisCO large subunit AS03 037 (Agrisera, Vannas, Švedska) razrijeđenog 1: 10 000, te sekundarnim antitijelom anti-rabbit DyLight® 550 AS11 1782 (Agrisera, Vannas, Švedska) razrijeđenog 1: 2 000, prikazana je na slici 14. Uzorci 1 – 4 prikazani na slici 14. su: 1 µg klorofila od uzoraka algi *Cryptophyte* (1, 2) te 1 µg klorofila (3) i 10 µg ukupnih proteina (4) od ekstrakta listova *Arabidopsis thaliana* (Agrisera, 2023). Slika 14. prikazuje da se imunodetekcijom velika podjedinica nalazi pri približno 50 kDa, te može odstupati od 55kDa.

Negativna kontrola za Western blot metodu dobivena je konvencionalnom ekstrakcijom, te pri određivanju uzoraka dobivenih toplinskom obradom vrpce nisu razvijene. Nedostatak vrpce objašnjava utjecaj topline na enzim. Visoke temperature (60 °C) uzorkuju denaturaciju proteina i gubitak katalitičke aktivnosti. Termalna denaturacija rezultira gubitkom trodimenzionalne strukture, što dovodi do rastvaranja i izlaganja hidrofobnih domena (Salvucci i sur., 2001). S obzirom na konformacijske promjene velike podjedinice enzima izazvane toplinom, onemogućena je imunodetekcija uzoraka dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom.

Kako je moguće procijeniti koji uzorak dobiven HVED ekstrakcijom ima najveću koncentraciju RuBisCO enzima samo na jednoj membrani, odabran je po jedan uzorak od HVED ekstrakcije s argonom i HVED ekstrakcije s dušikom. Prema slici 11 vidljivo je da su uzorci LHA većinom usklađene izraženosti vrpce, iako LHA1 uzorak ima najjače izraženu

vrpcu. Upravo zato je odabran LHA1 za kvantifikaciju MRM metodom. Kako bi lakše zaključili o utjecaju plina na ekstrakciju RuBisCO enzima iz listova šećerne repe, uz uzorak LHA1, uzorak LHN1 je također kvantificiran MRM metodom. LHA1 i LHN1 uzorci tretirani su pri 25 kV i 6 minuta, prema tablici 3.

Koncentracija RuBisCO proteina MRM metodom dobivena je preračunavanjem koncentracije izmjerenih peptida TFQGPPHGIQVER i AQAETGEIK s obzirom na molekulsku masu RuBisCO proteina (52,521 kDa). Rezultati koncentracije RuBisCO proteina u uzorcima dani su u tablici 12.

Tablica 12. Rezultati koncentracije RuBisCO proteina dobiveni MRM metodom LC/MS

Uzorak	Koncentracija RuBisCO proteina (µg/mL)
LHA1	81,32 ± 0,73
LHN1	11,83 ± 0,02

Ukupna koncentracija proteina u uzorku LHA1 je $26,44 \pm 1,59$ mg/mL s.t. (tablica 7), a koncentracija RuBisCO proteina $81,32 \pm 0,73$ µg/mL (tablica 12). Kod LHN1 ukupni proteini iznose $26,97 \pm 1,06$ mg/mL s.t. (tablica 7), a koncentracija RuBisCO proteina $11,83 \pm 0,02$ µg/mL (tablica 12). Primjetan je nesrazmjer ukupne koncentracije proteina i koncentracije RuBisCO enzima u usporedbi ova dva uzorka. Iako oba uzorka imaju sličnu koncentraciju ukupnih proteina, LHN1 uzorak ima čak 6,874 puta niži prinos RuBisCO enzima u obziru na LHA1.

Hladna plazma kao ionizirani plin može biti stvorena od različitih plinova, a tip plina ima značajan utjecaj na efikasnost plazme, a time i rezultate i kvalitetu ekstrakta. Pri tome različiti plinovi ioniziraju pri različitim naponima te tvore različite reaktivne vrste (Tenorio i sur., 2016). Plazma, stvorena visokonaponskim izbijanjem između dvije elektrode, injektira energiju direktno u vodeno okruženje i rezultira kemijskim i fizikalnim procesima (Boussetta i Vorobiev, 2014).

HVED ekstrakcija uzorkuje nastanak različitih slobodnih radikala, uključujući hidroksil radikal, što ovisi o sastavu zraka i uvjetima plazme, pri čemu je najznačajniji uvjet korišteni plin (Režek Jambrak i sur., 2021). Formiranje različitih reaktivnih vrsta tijekom HVED tretmana uključuje i, osim generiranja slobodnih radikala, moguću abraziju elektroda, što uzrokuje otpuštanje metala u ekstrakte (Nutrizio i sur., 2020).

Zabilježen je viši prinos RuBisCO enzima pri ekstrakciji s argonom kao radnim plinom u usporedbi s dušikom. Argon može dovesti do formacije hidroksilnih radikala, odnosno povišenja pH vrijednosti, što olakšava ekstrakciju, jer povećava topljivost RuBisCO enzima (Dukić i sur., 2023; Akyüz i Ersus, 2021). Kada se argon koristi kao radni plin, reagira s elektronima plazme, pobuđujući plin, a zatim reagira s molekulom vode, tvoreći OH- radikale (Režek Jambrak i sur., 2021).

Dukić i sur. (2023) navode kako pri ekstrakciji s dušikom kao radnim plinom, zbog električnog pražnjenja, dolazi do raspada stabilne, inertne molekule dušika u reaktivne dušikove vrste (engl. *reactive nitrogen species, RON*). RON u prisutnosti kisika i reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species, ROS*) mogu dovesti do snižavanja pH vrijednosti, što približava vrijednost otopine bliže pI vrijednosti RuBisCO proteina (Dukić i sur., 2023). Martin i sur. (2014) zabilježavaju vrijednosti pI RuBisCO enzima koje variraju oko 4,6 i 5,5, ovisno o vrsti organizma iz koje potječe. Za špinat, kukuruz, pamuk i duhan, zabilježene su vrijednosti pI od 4,4 do 4,7, a vrijednosti variraju zbog aminokiselinskog sastava male podjedinice (Udenigwe i sur., 2017). Stoga, niži prinos RuBisCO enzima dobiven HVED ekstrakcijom uz dušik, može biti objašnjen smanjenjem topljivosti proteina, zbog agregacije proteina uzorkovane smanjenjem elektrostatske odbojnosti aminokiselinskih ostataka (Dukić i sur., 2023).

Pri vrlo visokim ulaznim energijama za HVED ekstrakciju proteina iz sjemenki uljane repice i pogače sjemenki uljane repice od 0 do 400 kJ/kg u istraživanju kojega su proveli Barba i sur. (2015), opisanog u poglavlju 2.3.2.2. Primjena HVED ekstrakcije, dolazi do stagnacije i snižavanja prinosa ekstrakcije. Optimalna vrijednost energije iznosila je 240 kJ/kg, pri odnosu tekućine naspram otapalu 20:1. Smanjenje prinosa proteina u ekstraktima pri ulaznoj energiji višoj od 240 kJ/kg pripisali su koagulaciji proteina, što otežava ekstrakciju. Također, nabrojali su dva fenomena – posljedice HVED tretmana, odnosno djelovanja hladne plazme, koji također mogu uzorkovati smanjenje prinosa proteina: proizvodnja reaktivnih vrsta koji oksidiraju ciljane molekule te promjene u pH vrijednostima (Barba i sur., 2015). S obzirom na to da je kod uzoraka LHN1 i LHA1 upotrijebljen isti napon i vrijeme tretmana, smanjeni prinos RuBisCO enzima kod LHN1 ne može se objasniti razlikama u energiji.

Roselló-Soto i sur. (2014) navode značajan utjecaj pH vrijednosti na prinos proteina iz koštica maslina. Zabilježili su značajno povećanje prinosa proteina kada su povišili pH i ulaznu energiju za HVED tretman, zbog uništavanja veze proteina s lignoceluloznom frakcijom

koštice masline. S obzirom na to da je u listovima šećerne repe također prisutna lignocelulozna masa (Berlowska i sur., 2018), utjecaj povišenja pH na povećanje prinosa RuBisCO enzima, osim udaljavanja od izoelektrične točke RuBisCO enzima, može biti povećana dostupnost suhe tvari u listovima tako da uklanjaju fizičku barijeru koju tvori lignin (Roselló-Soto i sur., 2014).

Žuntar i sur. (2019) svojim su istraživanjem potvrdili da je HVED učinkovita ekstrakcijska metoda koja rezultira značajnim povećanjem prinosa zbog razaranja stanica uzoraka i poboljšavanja transporta mase. U svom istraživanju uporabom različitih otapala (voda, etanol), vremena tretiranja (3 minute, 6 minuta), različitih radnih plinova (dušik, argon) i primijenjenog napona (15, 20 i 25 kV), odnosno variranjem parametara HVED ekstrakcije uspjeli su opisati učinkovitost ekstrakcije fenola iz listova masline u usporedbi s konvencionalnom ekstrakcijom. Pokazali su da u 50 %-tnoj otopini etanola HVED tretman s argonom u trajanju od 9 minuta rezultira povećanim prinosom ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnom. Isto tako, HVED tretman pri 20 kV tijekom 3 minute s dušikom, imao je prinos čak 2,5 puta veći od konvencionalne ekstrakcije (Žuntar i sur., 2014).

5. ZAKLJUČCI

1. Moguća je valorizacija listova šećerne repe koji su otpad proizvodnje šećera iz šećerne repe. Listovi šećerne repe izvor su RuBisCO enzima, proteina topljive frakcije, koji se akumulira unutar kloroplasta te ima potencijalnu primjenu u prehrambenoj industriji zbog svojih nutritivnih i funkcionalnih svojstava.
2. Optimalni parametri ekstrakcije ukupnih proteina iz suhih listova šećerne repe pomoću visokonaponskog električnog pražnjenja za dobivanje maksimalnog prinosa su napon 20 kV i vrijeme tretmana 3 min.
3. Izmjerena koncentracija ukupnih proteina u ekstraktu varirala je od $14,27 \pm 0,53$ mg/g s.t. do $34,90 \pm 1,59$ mg/g s.t., ovisno o primijenjenom naponu, vremenu tretmana i o radnome plinu. MRM metodom kvantificirana je koncentracija RuBisCO proteina te iznosi $81,32 \pm 0,73$ μ g/mL za uzorak LHA1 te $11,83 \pm 0,02$ μ g/mL za uzorak LHN1.
4. Radni plin ima veliki utjecaj na prinos RuBisCO enzima: argon uzrokuje povišenje pH vrijednosti i olakšavanje ekstrakcije zbog bolje topljivosti RuBisCO enzima; dok dušik uzrokuje snižavanje pH vrijednosti i otežavanje ekstrakcije zbog agregacije proteina.
5. Fenolna ekstrakcija rezultira jasnijim vrpčama dobivenih imunodetekcijom RuBisCO enzima na membrani od HVED ekstrakcije, dok pri imunodetekciji uzoraka dobivenih toplinskom ekstrakcijom vrpce nisu prisutne zbog termalne denaturacije. Velika podjedinica RuBisCO enzima detektirana je u području 55 kDa.

6. LITERATURA

Abd El-Wahab M, El-Emary FAA, Ahmed MMS (2022) Comparative botanical studies of some cultivated groups of *Beta vulgaris* L. (*Chenopodiaceae*). *Archives of Agriculture Sciences Journal* **5**, 96-110. <https://doi.org/10.21608/aasj.2022.248231>

Ačkar Đ, Babić J, Jokić S, Jozinović A, Miličević B, Šubarić D (2022) Transitioning to Zero Waste in Agro-Food Sector – Novel Solutions. *Engineering Power* **17**, 2–10. <https://hrcak.srce.hr/277481>. Pristupljeno 15. prosinca 2022.

Agilent Technologies (2012) Agilent 6400 Series Triple Quad LC/MS Concepts Guide. https://www.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G3335-90135_QQQ_Concepts.pdf. Pristupljeno 12. siječnja 2023.

Agriseria (2023) RbcL Rubisco large subunit, form I (rabbit). <https://www.agrisera.com/en/artiklar/-rbcl-rubisco-large-subunit-form-i-rabbit.html>. Pristupljeno 22. veljače 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**, 127673. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127673>

Anderson L, Hunter CI (2006) Quantitative Mass Spectrometric Multiple Reaction Monitoring Assays for Major Plasma Proteins. *Mol Cell Proteomics* **5**, 573-588. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500331-MCP200>

Andersson I, Backlund A (2008) Structure and function of Rubisco. *Plant physiol bioch* **46**, 275-291. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.01.001>

Amagliani L, O'Regan J, Kelly AL, O'Mahony AJ (2017) The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins: A review. *Trends Food Sci Technol* **64**, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.008>

Amran MA, Palaniveloo K, Fauzi R, Satar NM, Mohidin TBM, Mohan G, Razak SA, Arunasalam M, Nagappan T, Sathiya Seelan JS (2021) Value-Added Metabolites from

Agricultural Waste and Application of Green Extraction Techniques. *Sustainability* **13**, 11432. <https://doi.org/10.3390/su132011432>

Balen B, Pavoković D, Peharec Štefanić P, Krsnik Rasol M (2011) Elektroforetske tehnike istraživanja proteina, Hrvatska Sveučilišna Naklada, Zagreb.

Barba FJ, Boussetta N, Vorobiev E (2015) Emerging technologies for the recovery of isothiocyanates, protein and phenolic compounds from rapeseed and rapeseed press-cake: Effect of high voltage electrical discharges. *Innov Food Sci Emerg Technol* **31**, 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.06.008>

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

Berlowska J, Binczarski M, Dziugan P, Wilkowska A, Kregiel D, Witonska I (2018) Sugar Beet Pulp as a Source of Valuable Biotechnological Products. U: Holban AM i Grumezescu AM (ured.) Handbook of Food Bioengineering, Advances in Biotechnology for Food Industry, Academic Press, 359-392. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811443-8.00013-X>

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

Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal biochem* **72**, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Burnette WN (1981) "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)

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

Carpentier SC, Witters E, Laukens K, Deckers P, Swennen R, Panis B (2005) Preparation of Protein Extracts from Recalcitrant Plant Tissues: An Evaluation of Different Methods for Two-Dimensional Gel Electrophoresis Analysis. *Proteomics* **5**, 2497–2507. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200401222>

Chang-Hui S (2019) Diagnostic Molecular Biology, Academic Press, str. 187-214.

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

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

Dukić J, Košpić K, Kelava V, Mavrić R, Nutrizio M, Balen B i sur. (2023) Alternative methods for RuBisCO extraction from sugar beet waste: A comparative approach of ultrasound and high voltage electrical discharge. *Ultrason Sonochem* **99**, 106535. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106535>

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>

El-Meleigi MA, Sheen SJ, Lowe RH (1980) Changes in fraction 2 protein and associated enzymes during tobacco growth. *Tobacco Science* **25**, 30-32.

FAO (2022) Sugarbeet. FAO- Food and Agricultural Organization

<https://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/sugarbeet/en/>.

Pristupljeno 5. listopada 2022.

Fasolin LH, Pereira R, Pinheiro A, Martins J, Andrade C, Ramos O i sur. (2019) Emergent food proteins – Towards sustainability, health and innovation. *Food Res Int* **125**, 108586. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108586>

Faurobert M, Pelpoir E, Chaïb J (2007) Phenol Extraction of Proteins for Proteomic Studies of Recalcitrant Plant Tissues. U: Thiellement H, Zivy M, Damerval C, Méchin V (ured.) *Plant Proteomics. Methods in Molecular Biology*, 1. izd., Humana Press, Totowa, str. 9-14.

Franca-Oliveira G, Fornari Tm Hernández-Ledesma B (2021) A Review on the Extraction and Processing of Natural Source-Derived Proteins through Eco-Innovative Approaches. *Processes* **9**, 1626. <https://doi.org/10.3390/pr9091626>

Gallagher SR (2012) SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* **6**, 7.3.1-7.3.28. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0703s06>

Gavahian M, Cullen PJ (2019) Cold Plasma as an Emerging Technique for Mycotoxin-Free Food: Efficacy, Mechanisms, and Trends. *Food Rev Int* **36**, 193-214 <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1630638>

Goldman A, Ursitti JA, Mozdzanowski J, Speicher DW (2015) Electroblotting from polyacrylamide gels. *Curr Protoc Protein Sci* **82**, 10.7.1-10.7.16. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1007s82>

Goldman IL, Janick J (2021) Evolution of Root Morphology in Table Beet: Historical and Iconographic. *Front Plant Sci* **12**, 689926. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.689926>

Hoffmann E (1996) Tandem mass spectrometry: a primer. *J Mass Spectrom* **31**, 129-137. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199602\)31:2<129::AID-JMS305>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199602)31:2<129::AID-JMS305>3.0.CO;2-T)

Hussain S, Jöudu I, Bhat R (2020) Dietary Fiber from Underutilized Plant Resources—A Positive Approach for Valorization of Fruit and Vegetable Wastes. *Sustainability* **12**, 5401. <https://doi.org/10.3390/su12135401>

Jung B, Ludewig F, Schulz A, Meißner G, Wöstefeld N, Flügge U i sur. (2015) Identification of the transporter responsible for sucrose accumulation in sugar beet taproots. *Nat Plants* **1**, 14001 <https://doi.org/10.1038/nplants.2014.1>

Källsten M, Pijnappel M, Hartmann R, Lehmann F, Kovac L, Lind SB, i sur. (2019) Application of triple quadrupole mass spectrometry for the characterization of antibody-drug conjugates. *Anal Bioanal Chem* **411**, 2569-2576. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01699-0>

Kiskini A, Vissers A, Vincken J, Gruppen H, Wierenga PA (2016) Effect of Plant Age on the Quantity and Quality of Proteins Extracted from Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Leaves. *J Agr Food Chem* **64**, 8305–8314. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03095>

Kurien BT, Scofield RH (2006) Western blotting. *Methods* **38**, 283-293. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.007>

Li Z, Fan Y, Xi J (2019) Recent advances in high voltage electric discharge extraction of bioactive ingredients from plant materials. *Food Chem* **277**, 246-260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.119>

Laemmli U (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Lamsal BP, Koegel RG, Gunasekaran S (2007) Some physicochemical and functional properties of alfalfa soluble leaf proteins. *LWT - Food Sci Technol* **40**, 1520-1526. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.11.010.h>

Mar Contrerasa M, Lama-Muñoz A, Gutiérrez-Pérez JM, Espínola F, Moyaa M, Castroa E (2019) Protein extraction from agri-food residues for integration in biorefinery: potential techniques and current status. *Bioresource Technol* **280**, 459-477.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.040>

Marinković B, Starčević Lj, Crnobarac J, Jaćimović G, Rajić M (2004) Sporedni proizvodi u proizvodnji šećerne repe kvalitetna stočna hrana. *Glasnik Zaštite Bilja* **27**, 114-118. <https://hrcak.srce.hr/164415>. Pristupljeno 15. prosinca 2022.

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

Martin AH, Nieuwland M, de Jong GA (2014) Characterization of heat-set gels from RuBisCO in comparison to those from other proteins. *J Agric Food Chem* **62**, 10783-91. <https://doi.org/10.1021/jf502905g>

Milião GL, de Oliveira APH, de Souza Soares L, Rodrigues Arruda T, Nascif Rufino Vieira E, de Castro Leite Junior BR (2022) Unconventional food plants: Nutritional aspects and perspectives for industrial applications. *Future Foods* **5**, 100124. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100124>

Moore C (2009) Introduction to western blotting, 1. izd., MorphoSys UK Ltd., Oxford, str 4-20.

Niemira BA (2012) Cold Plasma Decontamination of Foods. *Annu Rev Food Sci Technol* **3**, 125-142. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101132>

Nynäs, AL, Newson WR, Johansson E (2021) Protein Fractionation of Green Leaves as an Underutilized Food Source – Protein Yield and the Effect of Process Parameters. *Foods* **10**, 2533. <https://doi.org/10.3390/foods10112533>

Nutrizio M, Gajdoš Kljusurić J, Marijanović Z, Dubrović I, Viskiće M, Mikolaj E i sur. (2020) The Potential of High Voltage Discharges for Green Solvent Extraction of Bioactive Compounds and Aromas from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) – Computational Simulation and Experimental Methods. *Molecules* **25**, 3711.

<https://doi.org/10.3390/molecules25163711>

Parry M, Andralojc P, Mitchell R, Madgwick P, Keys A (2003) Manipulation of RuBisCo: the amount, activity, function and regulation. *J exp bot* **54**, 1321-33. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg141>

Piljac I (2006) Elektroforeza, 1. izd., Mediaprint – Tiskara Hrastić d.o.o., Zagreb.

Puertolas E, Barba FJ (2016) Electrotechnologies applied to valorization of by-products from food industry: Main findings, energy and economic cost of their industrialization. *Food Bioprod Processing* **100**, 172-184. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.06.020>

Režek Jambrak A, Ojha S, Šeremet D, Nutrizio M, Maltar-Strmečki N, Valić S i sur. (2021) Free radical detection in water after processing by means of high voltage electrical discharges and high power ultrasound. *J Food Process Preserv* **45**, 15176. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15176>

Robinson JW, Skelly Frame EM, Frame GM (2014) Undergraduate instrumental analysis, 7. izd., Taylor & Francis Group, LLL, Boca Raton.

Rocha CMR, Genisheva Z, Ferreira-Santos P, Rodrigues R, Vicente AA, Teixeira JA i sur. (2018) Electric field-based technologies for valorization of bioresources. *Bioresource Technol* **254**, 325-339. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.068>

Roselló-Soto E, Barba FJ, Parniakov O, Galanakis CM, Lebovka N, Grimi N i sur. (2015) High Voltage Electrical Discharges, Pulsed Electric Field, and Ultrasound Assisted Extraction of Protein and Phenolic Compounds from Olive Kernel. *Food Bioprocess Technol* **8**, 885–894. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1456-x>

Sá A, Moreno Y, Carciofi B (2020) Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. *Trends Food Sci Tech* **97**, 170–184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.011>

Salvucci ME, Osteryoung KW, Crafts-Brandner SJ, Vierling E (2001) Exceptional

sensitivity of Rubisco activase to thermal denaturation in vitro and in vivo. *Plant Physiol* **127**, 1053-64. <https://doi.org/10.1104/pp.010357>

Saravanan RS, Rose JK (2004) A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* **4**, 2522-32. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300789>

Smetana S, Aganovic K, Irmscher S, Heinz V (2018) Agri-Food Waste Streams Utilization for Development of More Sustainable Food Substitutes. U: Benetto E, Gericke K, Guiton M (ured.) *Designing Sustainable Technologies, Products and Policies*, Springer, Cham, str. 145–155. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66981-6_17

Takabe T, Tanaka Y, Takabe T (2015) Betaine in Sugar Beet. U: Preedy VR (ured.) *Betaine: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 5 izd., str. 9-28. <https://doi.org/10.1039/9781782628446-00009>.

Tamošiūnas V, Padarauskas A (2008) Comparison of LC and UPLC coupled to MS–MS for the determination of sulfonamides in egg and honey. *Chromatographia* **67**, 783- 788 <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0579-5>

Tena N, Asuero AG (2022) Up-To-Date Analysis of the Extraction Methods for Anthocyanins: Principles of the Techniques, Optimization, Technical Progress, and Industrial Application. *Antioxidants* **11**, 286. <https://doi.org/10.3390/antiox11020286>

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

Tenorio T, 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>

Tenorio TA, Gieteling J, de Jong GAH, Boom RM, van der Goot AJ (2016) Recovery of protein from green leaves: Overview of crucial steps for utilisation. *Food Chem* **203**, 402–408. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.092>

Thirumdas R, Sarangapani C, Annapure US (2015) Cold Plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing. *Food Biophys* **10**, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11483-014-9382-z>

Tolouie H, Hashemi M, Mohammadifar MA i Ghomi H (2018) Cold Atmospheric Plasma Manipulation of Proteins in Food Systems. *Crit Rev Food Sci* **58**, 2583-2597. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1335689>

Tomaszewska J, Bielinski D, Binczarski M, Berlowska J, Dziugan P, Piotrowski J i sur. (2018) Products of sugar beet processing as raw materials for chemicals and biodegradable polymers. *RSC Adv* **8**, 3161. <https://doi.org/10.1039/c7ra12782k>

Tylewicz U, Mannozi C, Castagnini JM, Genovese J, Romani S, Rocculi P i sur. (2022) Application of PEF- and OD-assisted drying for kiwifruit waste valorisation. *Innov Food Sci Emerg* **77**, 102952. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.102952>

Udenigwe CC, Okolie CL, Qian H, Ohanenye IC, Agyei D, Aluko RE (2017) Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase as a Sustainable and Promising Plant Source of Bioactive Peptides for Food Applications. *Trends Food Sci Technol* **69**, 74–82. <https://doi.org.10.1016/J.TIFS.2017.09.001>

UN (2022) Take Action for the Sustainable Development Goals. UN- United Nations <https://www.un.org/sustainabledevelopment/sustainable-development-goals/>. Pristupljeno 3. listopada 2022.

Vidović M, Franchin C, Morina F, Veljović-Jovanović S, Masi A, Arrigoni G (2020) Efficient protein extraction for shotgun proteomics from hydrated and desiccated leaves of resurrection *Ramonda serbica* plants. *Anal Bioanal Chem* **412**, 8299–8312. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02965-2>

Zeghioud H, Nguyen-Tri P, Khezami L, Abdeltif A, Aymen Amine A (2020) Review on discharge Plasma for water treatment: mechanism, reactor geometries, active species and combined processes. *J Water Process Eng* **38**, 101664. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101664>

Žuntar I, Putnik P, Bursać Kovačević D, Nutrizio M, Šupljika F, Poljanec A i sur. (2019) Phenolic and Antioxidant Analysis of Olive Leaves Extracts (*Olea europaea L.*) Obtained by High Voltage Electrical Discharges (HVED). *Foods* **8**, 248. <https://doi.org/10.3390/foods8070248>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis