

# Utjecaj toplinske i ultrazvučne ekstrakcije na prinos proteina i fenola iz osušenih peleta lišća šećerne repe

---

**Kovačićek, Sven**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*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:159:705974>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-19**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2024.

Sven Kovačiček

**UTJECAJ TOPLINSKE I ULTRAZVUČNE  
EKSTRAKCIJE NA PRINOS PROTEINA I  
FENOLA IZ OSUŠENIH PELETA LIŠĆA  
ŠEĆERNE REPE**



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



Horizon 2020  
European Union funding  
for Research & Innovation

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

## ZAHVALA

*Najljepše hvala mentorici, prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak na prenesenom znanju, vrijednim savjetima i uvidima i ukazanom strpljenju i razumijevanju tijekom izrade ovog rada te na pruženoj prilici da putem izrade diplomskog rada sudjelujem u provedbi jednog vrijednog i zanimljivog projekta.*

*Ovim putem uvelike se zahvaljujem i Josipi Dukić, mag.ing., na stručnom pristupu i savjetima iz kojih sam puno naučio te na ukazanom strpljenju i susretljivosti tijekom provedbe eksperimenata i pisanja diplomskog rada.*

*Naposljedku bih se htio zahvaliti svojoj predivnoj obitelji koja je oduvijek bila tu za mene i vjerovala u moj uspjeh te svojim dragim prijateljima i prijateljicama koji su mi uvelike uljepšali akademske dane kojih ću se zauvijek s radošću prisjećati.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

### UTJECAJ TOPLINSKE I ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE NA PRINOS PROTEINA I FENOLA IZ OSUŠENIH PELETA LIŠĆA ŠEĆERNE REPE

Sven Kovačićek, univ. bacc. ing. techn. aliment.  
0058215680

**Sažetak:** List šećerne repe je zbog svojeg povoljnog sastava proteina i fenolnih spojeva prepoznat kao vrijedan otpad industrije šećera s potencijalom valorizacije. Cilj rada je usporediti utjecaj toplinske i ultrazvučne metode ekstrakcije uz primjenu zelenih otapala na prinos ukupnih proteina i fenola te njihovu antioksidacijsku aktivnost iz osušenih peleta lišća šećerne repe. Primjena ultrazvučne ekstrakcije rezultirala je najvećim prinosom ukupnih proteina ( $55,38 \pm 2,57$  mg BSA/g s.tv.) i fenola ( $6,23$  mg  $\pm 0,56$  mg GAE/g s.tv.). Pri ultrazvučnoj ekstrakciji utvrđen je statistički značajan ( $p < 0,05$ ) utjecaj amplitude, vremena tretiranja i udjela etanola na prinos ukupnih proteina, odnosno statistički značajan ( $p < 0,05$ ) utjecaj amplitude i trajanja tretmana na prinos ukupnih fenola. Primjena maksimalne amplitude (100 %) tijekom 9 minuta i deionizirane vode kao otapala pokazala se optimalnom kombinacijom za ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju proteina i fenola iz osušenih peleta. Ultrazvuk visokog intenziteta pokazao se kao efikasna netopljinska metoda ekstrakcije iz osušenih peleta lišća šećerne repe.

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

**Rad sadrži:** 49 stranica, 5 slika, 6 tablica, 115 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

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

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Sven Karlović (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Mojca Čakić Semenčić (član)
4. prof. dr. sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić (zamjenski član)

**Datum obrane:** 19. studeni, 2024



## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study programme:** Food Engineering

INFLUENCE OF THERMAL AND ULTRASONIC EXTRACTION ON PROTEIN AND PHENOLYCS  
YIELD FROM DRIED SUGAR BEET LEAF PELLETS

Sven Kovačićek, univ. bacc. ing. techn. aliment.  
0058215680

**Abstract:** Due to favorable composition of proteins and phenolic compounds, the sugar beet leaf is a valuable by-product of the sugar industry. Thesis aims to compare the influence of thermal and ultrasonic extraction methods using green solvents on the yield of total proteins and phenols, and their antioxidant activity, from dried pellets of sugar beet leaves. Ultrasonic extraction resulted in the highest yield of total proteins ( $55,38 \pm 2,57$  mg BSA/g d.m.) and phenols ( $6,23$  mg  $\pm$   $0,56$  mg GAE/g d.m.). During ultrasonic extraction, a statistically significant ( $p < 0,05$ ) influence of the amplitude, treatment time and the proportion of ethanol on the yield of total proteins was observed, i.e. a statistically significant ( $p < 0,05$ ) influence of amplitude and treatment time was observed on the yield of total phenols. Application of maximum amplitude (100 %) for 9 minutes and deionized water as a solvent proved optimal for ultrasound-assisted extraction of proteins and phenols from dried pellets.

**Keywords:** *ultrasound assisted extraction, sugar beet leaf, proteins, phenols, solvent*

**Thesis contains:** 49 pages, 5 figures, 6 tables, 115 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

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

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

**Reviewers:**

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

**Thesis defended:** November 19<sup>th</sup>, 2024

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. ODRŽIVI RAZVOJ</b> .....	<b>2</b>
<b>2.2. PROTEINI</b> .....	<b>3</b>
<b>2.3. ANTIOKSIDANSI</b> .....	<b>4</b>
<b>2.4. ULTRAZVUK</b> .....	<b>5</b>
2.4.1. Ultrazvuk u prehrambenom inženjerstvu.....	6
<b>2.5. ŠEĆERNA REPA</b> .....	<b>8</b>
2.5.1. Otpad i nusprodukti procesa proizvodnje i prerade šećerne repe.....	9
2.5.2. List šećerne repe.....	10
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>13</b>
3.1.1. Suhi peleti lišća šećerne repe.....	13
3.1.2. Kemikalije.....	14
3.1.3. Uređaji.....	15
3.1.4. Pribor.....	16
<b>3.2. METODE</b> .....	<b>16</b>
3.2.1. Ekstrakcija primjenom ultrazvuka visokog intenziteta.....	16
3.2.1.1. <i>Postupak provođenja ekstrakcije primjenom ultrazvuka visokog intenziteta</i> .....	17
3.2.2. Toplinska ekstrakcija.....	18
3.2.2.1. <i>Postupak provođenja toplinske ekstrakcije</i> .....	19
3.2.3. Određivanje ukupnih proteina po Lowryju.....	19
3.2.3.1. <i>Izrada baždarnog dijagrama</i> .....	19
3.2.3.2. <i>Postupak provođenja metode po Lowryju</i> .....	20
3.2.4. Određivanje koncentracije ukupnih fenola.....	21
3.2.4.1. <i>Izrada baždarnog dijagrama</i> .....	21
3.2.4.2. <i>Postupak provođenja metode određivanja koncentracije ukupnih fenola</i> .....	22
3.2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.....	23
3.2.5.1. <i>Izrada baždarnog dijagrama</i> .....	23
3.2.5.2. <i>Postupak mjerenja antioksidativne aktivnosti DPPH metodom</i> .....	24
3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom.....	24
3.2.6.1. <i>Izrada baždarnog dijagrama</i> .....	24
3.2.6.2. <i>Postupak mjerenja antioksidativne aktivnosti FRAP metodom</i> .....	25
3.2.7. Određivanje ukupne suhe tvari sušenjem.....	25
3.2.8. Određivanje električne provodnosti i pH vrijednosti.....	26
3.2.9. Obrada podataka.....	26
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>28</b>

<b>4.1. REZULTATI I RASPRAVA FIZIKALNO-KEMIJSKIH ANALIZA PROVEDENIH NAKON TOPLINSKE I ULTRAZVUKOM VISOKOG INTENZITETA POTPOMOGNUTE EKSTRAKCIJE</b> .....	<b>28</b>
4.1.1. Rezultat ukupne suhe tvari u peletima .....	<b>28</b>
4.1.2. Vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara ekstrakata dobivenih ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom .....	<b>28</b>
4.1.3. Vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara ekstrakata dobivenih toplinskom ekstrakcijom .....	<b>32</b>
4.1.4. Usporedba i rasprava rezultata fizikalno-kemijskih parametara toplinskih ekstrakata i ekstrakata ultrazvukom potpomognute ekstrakcije .....	<b>35</b>
<b>4.2. REZULTATI STATISTIČKE OBRADJE PODATAKA</b> .....	<b>36</b>
4.2.1. Rezultati statističke obrade podataka ultrazvučno tretiranih uzoraka.....	<b>36</b>
4.2.2. Rezultati statističke obrade podataka toplinski tretiranih uzoraka.....	<b>39</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>41</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>42</b>

## 1. UVOD

Zbog globalnih izazova kao što su iscrpljivanje resursa, degradacija okoliša i sve veće potrebe ubrzano rastućeg stanovništva za hranom, principi održivog razvoja postali su od kritične važnosti za suvremenu proizvodnju hrane i stabilnost prehrambene industrije. S obzirom na veliki utjecaj koji prehrambena industrija ima na okoliš smatra se jednim od predvodnika zelene tranzicije pri čemu se inovacije u tehnologiji prerade i valorizacija nusprodukata smatraju ključem održivih sistema proizvodnje hrane.

Jednu inovativnu metodu prerade predstavlja ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija koja je u dosadašnjim istraživanjima pokazala znatan potencijal za poboljšanje procesa u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije. Primjenom ultrazvuka u ekstrakciji povećava se efikasnost procesa kroz smanjenu upotrebu otapala, veće prinose ekstrahiranih komponenti, manji utrošak energije, manju generaciju otpada. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija ujedno je i netopljiva metoda čime se osigurava zadržavanje vrijednih bioloških aktivnosti osjetljivih komponenata kao što su proteini i fenoli.

Šećerna repa predstavlja jednu od najbitnijih sirovina za proizvodnju šećera u svijetu. Velika količina listova šećerne repe koja zaostaje nakon žetve uobičajeno se tretira kao otpad, a rijetko biva korišteno kao stočna hrana ili prirodno gnojivo. Lišće šećerne repe povoljnog je kemijskog sastava te predstavlja dobru priliku za valorizaciju i proizvodnju novih proizvoda potičući pritom ciljeve održivog razvoja.

Cilj ovog istraživanja bio je usporediti utjecaj toplinske ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta na prinos ukupnih proteina i fenola iz osušenih peleta lišća šećerne repe te na antioksidacijsku aktivnost ekstrahiranih bioaktivnih spojeva. Osušeni peleti dobiveni su sušenjem „pulpe“ zaostale nakon prešanja soka iz svježeg lišća šećerne repe. U cilju je bilo utvrditi i utjecaj primjene različitih zelenih otapala (deionizirane vode, 25 %-tne otopine etanola, 50 %-tne otopine etanola) na prinos navedenih komponenti i antioksidacijsku aktivnost. Također, u cilju je bilo utvrditi optimalne uvjete ultrazvučne ekstrakcije provedbom statističke obrade rezultata.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. ODRŽIVI RAZVOJ

Dosadašnji trend u razvoju globalnog gospodarstva doveo je do brze i opsežne industrijalizacije popraćene degradacijom okoliša te prekomjernom i neravnomjernom potrošnjom. Navedeno je doprinijelo razvoju najvećih izazova za čovječanstvo 21. stoljeća, u vidu gubitka bioraznolikosti, povećanog iscrpljivanja prirodnih resursa i socio-ekonomske nejednakosti. Održivi razvoj podrazumijeva pristup prema rastu i razvoju civilizacije na način da se potrebe današnjeg stanovništva uspiju zadovoljiti bez negativnog utjecaja na mogućnost budućih generacija da zadovolje vlastite potrebe. Definicija održivog razvoja formirana je u sklopu izvješća Svjetske Komisije za okoliš i razvoj 1987. godine formalno naslovljenog „Naša zajednička budućnost“ („*Our Common Future*“), poznatijeg kao „Bruntland izvješće“, i podnesenog u jeku rastuće osviještenosti stanovništva o negativnim posljedicama klimatskih promjena i postojećih intra i internacionalnih nejednakosti (Hajian i Kashani, 2021; WCED, 1987). U svojoj suštini, održivi razvoj zagovara odgovornu, pametnu i kreativnu upotrebu prirodnih resursa, socijalne politike temeljene na pravednosti svih ljudi neovisno o dobi, rasi i spolu te dugoročnu ekonomsku stabilnost temeljenu na gospodarskom rastu bez negativnih utjecaja na prirodu i stanovništvo. Prihvaćanjem ciljeva održivog razvoja i inkorporacijom definiranih praksi kreira se mogućnost zaštite osjetljivih ekosustava, smanjenja emisije stakleničkih plinova i očuvanja vrijednih resursa za buduće generacije (Moyer i Hedden, 2020). Koncept održivog razvoja je od ključne vrijednosti za budućnost proizvodnje hrane s obzirom da se prema dosadašnjem trendu očekuje brzi porast broja stanovnika koji će do početka 2050., prema nekim procjenama, vrlo vjerojatno premašiti brojku od 9 milijardi (Adam, 2021). Ususret porastu stanovnika sektor proizvodnje hrane se suočava i s ozbiljnim posljedicama klimatskih promjena koje uzrokuju gubitke sirovina za proizvodnju što posljedično ugrožava sigurnost lanca opskrbe. Naknadno na navedeno, pretpostavlja se kako će globalna proizvodnja hrane porasti za 70 % što za sobom povlači i povećane potrebe za sirovinama i energijom (Van Dijk i sur., 2021). Stoga se inovacije u prehrambenom sektoru sve više orijentiraju prema novim, energetski efikasnijim i okolišno prihvatljivijim sirovinama i metodama procesiranja koje su prepoznate kao vrijedni alati za dostizanje ciljeva održivog razvoja (Arshad i sur., 2021; Herrero i sur., 2021; Chemat i sur., 2020; Ng i sur., 2020; Henchion i sur., 2017).

## 2.2. PROTEINI

Proteini su esencijalne makromolekule koje se, zbog svojih raznolikih uloga i važnosti u biokemijskim procesima i strukturalnim elementima, pronalaze u svim živim bićima. Služe kao gradivni blokovi za razna tkiva, enzime, hormone i tijela imunološkog sustava. Prema svojoj strukturi su polimeri sastavljeni od međusobno povezanih monomernih jedinica aminokiselina. U velikoj većini proteina zastupljeno je 20 osnovnih aminokiselina, izuzev hidroksilizina i hidroksiprolina koji se mogu pronaći u nekim životinjskim proteinima (Geissler i Powers, 2023). Od 20 standardnih aminokiselina njih 8 (leucin, izoleucin, valin, fenilalanin, triptofan, metionin, treonin, lizin) je esencijalno što znači da se moraju unositi konzumacijom hrane (Mann i sur., 2023). Zahvaljujući prirodi aminokiselina postoje milijuni mogućih verzija proteina iz čega proizlazi njihova kompleksnost i svestrana uloga u biokemijskim procesima. Struktura proteina organizirana je u četiri razine: primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvaternu (Geissler i Powers, 2023). Primarna struktura određena je redoslijedom aminokiselina koje protein sadrži. Sekundarna struktura definira se kao energetska najpovoljnija struktura koju protein zauzima duž y-osi zamišljene ravnine. Tercijarna struktura ostvaruje se savijanjem koje je uzrokovano interakcijama aminokiselinskih ostataka u obliku nekovalentnih van der Waalsovih sila i vodikovih veza te kovalentnih disulfidnih mostova. Kvaternu strukturu zauzimaju proteini građeni od više proteinskih podjedinica koje su međusobno povezane nekovalentnim vezama. Struktura proteina određuje njihovu biološku funkciju i stupanj probavljivosti (Mann i sur., 2023). Razumijevanjem ove strukture dobiva se uvid u nutritivnu kvalitetu proteina što doprinosi konstantnom poboljšanju nutritivnih smjernica (Ajomiwe i sur., 2024). Proteini se u gastrointestinalnom sustavu razgrađuju, posredstvom proteolitičkih enzima, na pojedinačne aminokiseline koje sadrže, pri čemu iste ljudsko tijelo koristi za anabolizam odnosno izgradnju vlastitih proteina. Usprkos svojoj važnosti za normalno funkcioniranje organizma, proteini se ne akumuliraju u tijelu već se konstantno razgrađuju i resintetiziraju, a višak biva izlučen putem urea ciklusa. S obzirom na esencijalnu važnost proteina u ljudskoj prehrani i potrebu za njihovom svakodnevnom konzumacijom, prehrambeni sektor mora biti u mogućnosti zadovoljiti nutritivne potrebe stanovništva za proteinima. Očekuje se da će u budućnosti, uz porast broja stanovnika, glavni pokretači porasta potražnje za hranom bogatom proteinima biti povećanje u udjelu stanovništva s većom platežnom moći, rastuća urbanizacija i sve veći udio starije populacije koja je svjesna uloge proteina u zdravom procesu starenja ljudi (Ames, 2018; Henchion i sur., 2017). Iako biljni izvori proteina čine više od polovicu ukupne svjetske opskrbe proteinima, izvori proteina životinjskog porijekla poput mesa i mliječnih proizvoda imaju superiorniji aminokiselinski profil i probavljivost što ih čini najboljim izvorom proteina za ljudsku prehranu (Yavuz i Yavuz, 2024; Henchion i sur., 2017). Unatoč tome, mnogi potrošači se okreću

biljnim izvorima proteina što zbog etičkih razloga što zbog povećane svijesti o povezanosti industrijaliziranog uzgoja životinja i proizvodnje mesa s klimatskim promjenama, uništavanjem ekosustava, neodrživim korištenjem resursa i razvojem novih zoonoza (Henchion i sur., 2022; Espinosa i sur., 2020). Kao neki od novih i obećavajućih izvora proteina mogu se navesti: alge, kukci, mikrobne mase te proteini iz poljoprivrednog otpada i nusproizvoda poput proteina lišća (Balfany i sur., 2023; Dolganyuk i sur., 2023; Geada i sur., 2021; Mintah i sur., 2020).

### **2.3. ANTIOKSIDANSI**

Antioksidansi su molekule od vitalne važnosti za ispravno funkcioniranje stanica i biokemijskih procesa jer pružaju zaštitu od oksidativnog stresa i negativnih reakcija sa slobodnim radikalima. Slobodni radikali predstavljaju skupinu visoko reaktivnih molekula s nesparenim elektronima koje mogu prouzročiti štetu na staničnim strukturama i molekulama poput membrana, genetskog materijala, enzima što za posljedicu može imati razvoj upalnih stanja i kroničnih bolesti poput raka, ateroskleroze, neurodegenerativnih bolesti i sl. (Jomova i sur., 2023; Akbari i sur., 2022). Antioksidativna neutralizacija slobodnih radikala uključuje nekoliko zasebnih mehanizama: prijenos atoma vodika, prijenos elektrona, prijenos elektrona sekvencijalnim gubitkom vodika i kelaciju prijelaznih metala (Zeb, 2020). U uvjetima homeostaze, ljudsko tijelo je sposobno koristiti endogene enzimatske (katalaza, superoksid dismutaza, glutation peroksidaza) i neenzimatske (glutation, ubikvinol) antioksidanse u borbi protiv oksidativnog stresa i slobodnih radikala koji nastaju kao rezultat metaboličkih procesa (Chaudhary i sur., 2023; Aziz i sur., 2019). Prisutnost eksternih stresora poput UV zračenja i polutanata u zraku nadmašuje intrinzičnu sposobnost čovjeka da se zaštiti od istih i zahtijeva unos dodatnih antioksidansa iz hrane, a većinom iz biljnih izvora (Akbari i sur., 2022; Zeb, 2020). Fenolni spojevi predstavljaju skupinu prirodnih antioksidansa koji se nalaze u raznoj biljnoj hrani. Obično se biosintetiziraju preko puta šikiminske kiseline iz fenilalanina ili tirozina kao početnih reaktanata, a za njihovu antioksidativnu sposobnost je odgovorna hidroksilna skupina u benzenskom prstenu (Zeb, 2020). Fenolni spojevi spadaju u skupinu primarnih antioksidansa koji se odlikuju visokom efikasnošću i lakoćom regeneracije (Flieger i sur., 2021). Konzumacija fenolnih spojeva iz hrane ima dokazana pozitivna djelovanja na ljudsko zdravlje neka od kojih su: protuupalno, antikancerogeno, antiviralno, pospješuju funkciju imunskog sustava, sprječavaju razvoj bolesti gastrointestinalnog sustava i dr. (Pisoschi i sur., 2021). Iako su antioksidativna priroda fenolnih spojeva i njihova dobrobit za ljudsko zdravlje poznati od prije, u posljednja 2 desetljeća je došlo do velikog porasta u znanstvenoj literaturi koja se bavi njihovom tematikom (Zeb i sur., 2020). Ususret modernim izazovima poput klimatskih promjena, porasta količine vanjskih stresora i ogromnih količina prehrambenog otpada, znanstvena istraživanja u prehrambenoj industriji su se orijentirala prema upotrebi naprednih

zelenih tehnika procesiranja u ekstrakciji fenolnih spojeva iz već postojećih izvora, ali jednako tako i vrijednih otpada poput lišća te nusproizvoda poput komine nastale proizvodnjom sokova i vina i mekinja prilikom proizvodnje brašna (Gil-Martin i sur., 2022; Palos-Hernández i sur., 2022; Fărcaș i sur., 2021; Panzella i sur., 2020; Proseprio i sur., 2020).

## **2.4. ULTRAZVUK**

Ultrazvuk se odnosi na zvučne valove čija je frekvencija više od gornje granice frekvencije koju može percipirati ljudski sluh, odnosno frekvencija ultrazvučnih valova iznosi iznad 20 kHz. Za razliku od zvučnih valova koje ljudi mogu percipirati, ultrazvučni valovi posjeduju manju valnu duljinu te stoga i veću snagu tj. energiju. Navedena činjenica omogućuje ultrazvučnim valovima da prodiru u materijale i stupaju u specifične interakcije s istima, a koje ne bi bile moguće upotrebom ljudskom uhu osjetljivih valnih frekvencija. S obzirom na frekvenciju i snagu, ultrazvuk se općenito može podijeliti na ultrazvuk niske snage (dijagnostički) i ultrazvuk visoke snage (terapeutski/industrijski). Većini ljudi pri prvom spomenu na ultrazvuk na pamet pada kategorija ultrazvuka niske snage s kojom se ljudi često susreću jer nalazi široku primjenu u medicini. Pritom zvučni valovi veoma visokih frekvencija (iznad 5 MHz), zbog svoje niske energije, omogućuju ne destruktivan način predočavanja unutartjelesnih struktura poput organa i tkiva te čak i fetusa tijekom trudnoće. S druge strane, ultrazvučni valovi niže frekvencije posjeduju veću energiju zbog koje je moguće odvijanje fenomena prijelazne akustične kavitacije (Mason i Cintas, 2002). Do pojave navedenog fenomena dolazi kada ultrazvučni valovi visoke snage dospiju u interakciju s tekućinom (Wen i sur., 2019). Zbog sinusoidne prirode širenja zvučnih valova dolazi do naizmjenične pojave zona kompresije i razrjeđivanja (loma) (Leong i sur., 2011). U fazi razrjeđivanja dolazi do formiranja mjehurića zraka jer vrijednost tlaka padne ispod tlaka pare tekućine što omogućava otopljenim plinovima da „ispare“ u mikro lokacijama tekućine. Istovremeno pad tlaka je toliko velik da nadmašuje privlačne sile molekula otopine pri čemu otopljeni plinovi difundiraju u stvorene „pukotine“ (Wen i sur., 2019; Leong i sur., 2011). Formirani mjehurići naizmjenice rastu, tijekom faze razrjeđivanja (dolazi do difuzije novih molekula plina), i smanjuju se, tijekom faze kompresije, sve dok ne dostignu kritičnu veličinu (rezonantna veličina) odnosno kritični radijus pri čemu u sljedećoj fazi kompresije dolazi do silovite implozije mjehurića (Leong i sur., 2011; Barbosa-Cánovas i Rodriguez, 2002). Uslijed implozije, na mikrolokacijama u tekućini formiraju se zone ekstremno visokih temperatura (5000 K), tlaka (100 MPa) i hidrodinamičkih sila smicanja, a navedena kombinacija rezultira pojačanim prijenosom mase (Wen i sur., 2018; Jambrak i sur., 2008). Osim toga, prijelazna akustična kavitacija dovodi do određenih fizikalnih efekata odnosno do pojave mikro mlazova, mikro turbulencija i sudara velikih brzina između pojedinačnih čestica u otopini koji posljedično mogu



ubrzati odvijanje kemijskih reakcija te povećati prinos ekstrakcije željenih komponenti iz staničnog matriksa (Kadam i sur., 2013; Shirsath i sur., 2012; Ince i sur., 2001).

#### 2.4.1. Ultrazvuk u prehrambenom inženjerstvu

U suvremenom prehrambenom inženjerstvu i proizvodnji, primjena ultrazvuka predstavlja iznimno vrijednu tehnologiju koja je, osim svoje svestrane primjene, omogućila povećanje efikasnosti prerade, bolju kvalitetu proizvoda i smanjenje energetske potrošnje. Bilo da se radi o ultrazvuku visokog ili niskog intenziteta, ova tehnologija nalazi široku primjenu u prehrambenoj industriji kako u analiziranju kvalitete tako i u procesima proizvodnje, sanitacije i obrade otpada. Neke od prednosti korištenja ultrazvuka u procesiranju hrane uključuju: brži prijenos energije i mase, nižu temperaturu procesiranja, smanjenu veličinu opreme, bolje miješanje i smanjenje koraka u procesu prerade (Chemat i Khan., 2011).

Filtracija predstavlja fizikalni proces odvajanja čvrstih tvari od tekućih ili plinovitih tvari u kojoj su sadržani ili obrnuto, odvajanje tekućine ili plinovitog fluida od nepoželjnih čvrstih tvari. Tijekom filtracije dolazi do zadržavanja čvrstih tvari unutar i na porama korištenog sredstva za filtraciju. Pritom dolazi do postepenog začepljenja pora i smanjenja fluksa (količine tvari koja prolazi kroz jedinicu površine filtera), odnosno efikasnosti samog procesa. Koncentracija čvrste tvari se polarizira odnosno stvara se tzv. filterski „kolač“. Upotrebom ultrazvuka visoke snage, fizikalni i mehanički utjecaji akustične kavitacije dovode do razbijanja nastalog „kolača“ i smanjenja polarizacije koncentracije povećavajući tako efikasnost procesa bez utjecaja na permeabilnost membrane (Chemat i Khan, 2011). Mao i sur. (2020) su u svojoj studiji primjenom ultrazvučne tehnologije povećali permeancu mikrofiltracijske membrane za 48 % što je rezultiralo povećanom efikasnošću odvajanja vode iz emulzija tipa ulje u vodi. Depolimerizacija je proces razgradnje velikih, kompleksnih molekula kao što su polisaharidi, proteini i masti, na njihove manje strukturne jedinice (monomere ili oligomere). Proces depolimerizacije omogućuje modifikacije strukture, funkcije i nutritivne vrijednosti tretirane procesirane hrane (Zhou i sur., 2022). Upotreba ultrazvuka tako može rezultirati boljom topljivosti i sposobnosti pjenjenja proteina sirutke te trajnom i poželjnom promjenom reoloških parametara (Chemat i Khan, 2011; Jambrak i sur., 2008). Neki od proizvoda zahtijevaju proces kuhanja ili pečenja pri čemu se prerađeni sadržaj drži u odgovarajućim kalupima s premazom protiv sljepljivanja (npr. politetrafluoretilen) kojeg se treba povremeno mijenjati što iziskuje dodatne troškove i gubitak produktivnosti (Chemat i Khan, 2011). Upotrebom ultrazvuka ostvaruje se relativno visokofrekventno gibanje između kalupa i prehrambenog proizvoda što poboljšava odvajanje i čišćenje te eliminaciju skupih premaza, a slična upotreba se može primijeniti u procesu ekstruzije za smanjivanje otpora pri protjecanju materijala (Singla i Sit, 2021; Chemat i Khan, 2011). Jedna od popularnih primjena ultrazvuka je u procesu rezanja. Pritom je oštrica putem

vratila spojena na izvor ultrazvuka, a oblik oštrice nije ograničen (Chemat i Khan, 2011). Najčešće se koristi za rezanje lomljivih (torte, slastice, pekarski proizvodi), masnih (sir) i ljepljivih proizvoda zbog velike preciznosti, ujednačenosti i samostalnog „automatskog“ čišćenja koje pružaju ultrazvučne vibracije (Arnold i sur., 2009; Schneider i sur., 2009). Primjena ultrazvuka u procesu smrzavanja hrane rezultira bržim prijenosom topline te bržom formacijom kristalića leda ujednačene veličine što skraćuje vrijeme procesa i manje gubitke uzrokovane destrukcijom staničnih struktura (Ma i sur., 2021). Također, istražuje se i primjena ultrazvuka u odmrzavanju. Takva primjena se većinom temelji na kombinaciji s već poznatim inovativnim načinima odmrzavanja poput korištenja mikrovalova infracrvenog zračenja (Taha i sur., 2024). Tako su Cai i sur. (2019) zamijetili smanjenu migraciju vode i stupanj denaturacije proteina pri odmrzavanju riblje vrste *Sciaenops ocellatus* korištenjem ultrazvuka u kombinaciji s mikrovalovima ili infracrvenim zračenjem dok su Gambuteanu i Alexe (2015) naznačili kako upotreba ultrazvuka niskog intenziteta (frekvencije 25 kHz, intenziteta 0,6 W/cm<sup>2</sup>) skraćuje vrijeme odmrzavanja svinjskih *Longissimus dorsi* mišića za 87 % u usporedbi s konvencionalnim načinima. Ultrazvuk se veoma uspješno primjenjuje za procese emulgiranja jer dovodi do: tvorbe čestica mikronskih veličina i veoma uske distribucije veličine, stabilnijih emulzija bez potrebe za dodavanjem sredstava za emulgiranje i smanjene potrebe za energijom u odnosu na konvencionalne procese (Zhou i sur., 2021). Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija pruža izrazite prednosti u odnosu na konvencionalne metode (Shen i sur., 2023). Prema dosadašnjim istraživanjima neke od prednosti korištenja ultrazvuka u ekstrakciji bioaktivnih komponenti su: skraćeno vrijeme procesa ekstrakcije bez gubitka prinosa, niska temperatura procesa čime se smanjuje degradacija osjetljivih spojeva, smanjen utrošak energije i otapala, mogućnost korištenja vode kao otapala čime se eliminira toksični otpad, mogućnost primjene u ekstrakciji raznovrsnih bioaktivnih spojeva, jednostavnost procesa te olakšano naknadno odvajanje i pročišćavanje ekstrahiranih komponenti (Oprescu i sur., 2022; Panadare i sur., 2020; Chemat i sur., 2017; Lavilla i Bendicho, 2017; Mnayer i sur., 2017; Bilgin i sur., 2013). Navedene prednosti ultrazvuk duguje mehaničkim i toplinskim efektima akustične kavitacije koje uzrokuju razaranje staničnih membrana, povećan prijenos mase i temeljitiji prodor otapala u intracelularni matriks (Lavilla i Bendicho, 2017). Jedna od najbitnijih primjena ultrazvuka je u očuvanju nutritivne kvalitete i zdravstvene ispravnosti hrane. Putem fenomena akustične kavitacije ultrazvuk uzrokuje mehanički i kemijski (slobodni radikali) uvjetovana oštećenja staničnih membrana i unutarstaničnih struktura mikroorganizama te strukturne promjene u enzimima dovodeći do njihove inaktivacije. Optimalno konzerviranje hrane postiže se kombinacijom s drugim metodama poput korištenja hidrolitičkih enzima, povišenog tlaka, pasterizacije, koncentriranih otopina soli i sl. (Taha i sur., 2024; Guo i sur., 2020; Alenyorege i sur., 2019; Fan i sur., 2019). Unatoč svemu navedenom postoje i određene

mane ultrazvučne tehnologije poput: kompliciranog određivanja optimalnih parametara za razne primjene, moguće oslobađanje toksičnih metala u tragovima, osjetljivost sonde (abrazije) i potrebna zamjena na godišnjoj razini zbog postepenog oštećenja uzrokovano akustičnom kavitacijom (Taha i sur., 2024).

## 2.5. ŠEĆERNA REPA

Šećerna repa, znanstvenog naziva *Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*, dvogodišnja je biljna vrsta koja pripada porodici *Amaranthaceae* te je jedna od trenutno četiri kultivirane podvrste repe i jedina koja se koristi za proizvodnju šećera (Zicari i sur., 2019). Uzgoj šećerne repe rasprostranjen je širom svijeta, ali uglavnom najbolje uspijeva u umjerenom podneblju između 30 i 60 ° sjeverne geografske širine jer ima relativno visoke potrebe za vodom što zahtjeva dovoljnu količinu kiše ili adekvatnu opremu za navodnjavanje u sušnijim i toplijim predjelima (Hassanli i sur., 2010; Draycott, 2008). Osim za proizvodnju šećera, šećerna repa je važna i kao kultura koja se sadi u rotaciji s drugim kulturama poput žitarica i leguminoza što omogućuje međusobno nadopunjavanje pojedinih nedostataka poput nedostatka nutrijenata, neutralizaciju proliferacije uzročnika bolesti i degradacije strukture tla u slučaju uzastopnog uzgoja samo jedne od ovih kultura (Boincean i sur., 2019).

Razne vrste repe sadile su se još od doba starih Rimljana kao vrtno povrće te su se koristile u kulinarske svrhe većinom zbog svojih listova koji su se pripremali na način sličan današnjoj pripremi špinata (Draycott, 2008). Činjenica da šećerna repa sadrži šećer istovjetan onome iz šećerne trske spoznata je još u prvoj polovini 18. stoljeća kada je 1747. godine kemičar Andreas Marggraf u svojim eksperimentima s repom uspio izolirati šećer, no neuspjesi u industrijalizaciji procesa uvelike su usporili razvoj šećerne repe kao jednog od bitnih izvora šećera (Hanelt i sur., 2001). Vrsta koja je danas poznata kao šećerna repa kultivirana je relativno nedavno odnosno krajem 18. stoljeća iz šleskog varijeteta s korijenom bijele boje (Draycott, 2008). Razvoj industrijaliziranog procesa prerađivanja i varijeteta s većim udjelom šećera uvelike je uvjetovan početkom Napoleonskih ratova tijekom kojih je britanska blokada kontinentalne Europe rezultirala obustavom uvoza šećera, proizvedenog iz šećerne trske, koji se velikom većinom proizvodio u britanskim kolonijama pa se interes za uzgoj i prerađivanje šećerne repe ponovno probudio (Villadsen, 2009).

Danas je šećerna repa druga najkultiviranija kultura za proizvodnju šećera, prva je dakako i dalje šećerna trska na koju otpada oko 80 % ukupne svjetske proizvodnje šećera (Gonzalez i Björnsson, 2022). Uzgoj šećerne repe uvelike otpada na europske zemlje odnosno zemlje Europske Unije (EU) te Rusiju i Ukrajinu, a prema podacima Europske Komisije (EK) na zemlje

EU otpada oko 50 % svjetske proizvodnje ovog vrijednog izvora šećera (Europska Komisija, 2021).

#### 2.5.1. Otpad i nusprodukti procesa proizvodnje i prerade šećerne repe

Općenito tijekom procesa proizvodnje hrane dolazi do nastanka određenih nusproizvoda i otpada. Nusproizvodi su sekundarni proizvodi nastali tijekom procesa proizvodnje primarnog proizvoda, a sadrže određenu ekonomsku vrijednost te se mogu koristiti u različite svrhe. S druge strane otpad predstavlja sporedne produkte koji nemaju ekonomsku vrijednost i/ili ih je nemoguće ponovno iskoristiti. Shodno navedenom, tijekom ekstrakcije šećera iz šećerne repe zaostaju različiti nusproizvodi i otpad u određenim fazama procesa.

Pulpa zaostala nakon ekstrakcije šećera iz rezanaca šećerne repe većinom se preša i koristi kao stočna hrana. U posljednje vrijeme su se, razvojem biotehnologije, razmotrili napredni načini tretiranja i fermentacije ovog nusproizvoda. Pulpa šećerne repe sadrži 60-70 % ugljikohidrata u suhoj tvari od kojih skoro 90 % čine celuloza, hemiceluloza i pektin (Joanna i sur., 2018). Stoga novi biotehnoški procesi imaju za cilj iskoristiti ovaj bogati ugljikohidratni sadržaj kao potencijalni izvor za proizvodnju biogoriva, biopolimera i aditiva u prehrambenoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji (Tomaszewska i sur., 2018). Upotreba hidrolizirane pulpe šećerne repe razmatra se i kao koristan medij za proizvodnju mikrobnih proteina pa su tako Patelski i sur. (2015) u svojoj studiji uzgojili 5 vrsta kvasaca na hidrolizatu pulpe obogaćenom mineralima pri čemu su nastale kvaščeve biomase u prosjeku sadržavale oko 50 % proteina u suhoj tvari.

Melasa je gusta smeđa tekućina koja nastaje na kraju procesa kristalizacije saharoze iz ugušćenog šećernog sirupa iz kojeg više nije ekonomski isplativo provoditi daljnju kristalizaciju saharoze. Oko 50 % sastava melase čine šećeri odnosno zaostala saharoza te glukoza i fruktoza dok ostatak otpada na minerale poput kalcija i kalija te dušikove spojeve. Zbog svojeg sastava i kalorijske vrijednosti nalazi upotrebu kao dodatak stočnoj hrani te za proizvodnju etanola (Sanchez i Cardona, 2008). Coca i sur. (2015) su u svojoj studiji dokazali mogućnost korištenja vinase (nusprodukta fermentacije melase) kao kulturnog medija za uzgoj cijanobakterije *Spirulina platensis* u svrhu proizvodnje proteina iz stanične biomase.

Dosad je nakon žetve šećerne repe bivalo uobičajeno njeno zaostalo lišće iskoristiti u obliku stočne hrane ili kompostirati kako bi se „izgubljeni“ nutrijenti tijekom rasta repe vratili u tlo pripremajući ga tako za naredne usjeve. Novim istraživanjima o mogućnosti valorizacije otpada nastalih pri proizvodnji i preradi korjenastog povrća, pa tako i listova šećerne repe, ukazano je na brojne vrijedne komponente koje sadrže poput proteina, vlakana i spojeva antioksidativnog

djelovanja (Zhou i sur., 2023). Također, Gigot i sur. (2013) su u svojoj studiji istražili jedan zanimljiv način valorizacije lista šećerne repe, a koji uključuje ekstrakciju enzima hidroperoksid liaze odgovornog za proizvodnju C6-aldehidnih spojeva koji doprinose karakterističnoj svježoj aromi lišća i zelenila i na taj način ukazali da je list šećerne repe moguće razmatrati i kao sirovinu u proizvodnji aroma za potrebe raznih industrija. Također, Ayyat i sur. (2024) su u svojoj studiji zaključili kako zamjena ribljeg brašna s proteinskim koncentratom lista, dobivenim iz lišća šećerne repe i mrkve, u udjelu od 75 % ne narušava stupanj rasta i zdravlje pri hranjenju ribe vrste *Oreochromis niloticus* što daje prostor za daljnja istraživanja i smanjenje troškova ribljeg uzgoja.

#### 2.5.2. List šećerne repe

Lišće, kao i kod svake druge biljke koja provodi fotosintezu, šećerne repe ključno je za njezin rast i razvoj. Lišće šećerne repe primarno služi za proces fotosinteze koji je, između ostaloga, od iznimne važnosti za preživljavanje biljke. Pojednostavnjeno rečeno, tijekom procesa fotosinteze svjetlosna energija se prevodi u kemijsku energiju, odnosno u šećer koji šećerna repa asimilira i pohranjuje u svojem korijenu kako bi joj služio kao izvor energije u daljnjim stadijima razvoja. Osim što vrši važnu biološku ulogu, lišće šećerne repe krasi i povoljan nutritivni profil (Aramrueang i sur., 2017). S obzirom da lišće čini oko 30 % cijele biljke važno je razmotriti primjenu ovog otpada kao potencijalnu sirovinu za potrebe održive industrijske proizvodnje (Tenorio, 2017). Povoljan nutritivni profil listova ne odnosi se samo na sadržane makronutrijente. S aspekta mikronutrijenata listovi biljaka, pa tako i listovi šećerne repe, općenito predstavljaju dobar izvor minerala (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn), vitamina (A, C, E, K) te fitokemikalija (klorofil, karoten) i sekundarnih metabolita, za neke od kojih je dokazano da imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje (Zewail i sur., 2020; Tenorio, 2017; Gaweł, 2012).

Većina proteina (oko 70 %) u stanicama listova sadržana je u kloroplastu gdje obavljaju delikatnu funkciju fotosinteze (Buchanan, 2003). Proteini se dijele na topljivu i netopljivu frakciju pri čemu skoro polovinu topljive proteinske frakcije čini enzim ribuloza 1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza (RuBisCO) koji vrši ulogu fiksacije CO<sub>2</sub> u procesu fotosinteze (Tenorio, 2017). RuBisCO se sastoji od 8 velikih podjedinica (53 kDa) i 8 malih podjedinica (14 kDa) koje se zajedno sjedinjuju u veliki proteinski kompleks (560 kDa) (Udenigwe i sur., 2017). RuBisCO se smatra najzastupljenijim proteinom u prirodi s obzirom da je prisutan u stanicama svih organizama koji vrše fotosintezu, a alternativnim izvorom proteina počeo se, zbog nedostatka i potrebe za proteinima, razmatrati već tijekom Drugog svjetskog rata (Nynäs, 2018). Za potrebe ljudske prehrane, RuBisCO se prvenstveno ističe povoljnom nutritivnom vrijednošću, odnosno sadržaj i omjer aminokiselina koje se nalaze u ovom proteinu smatraju se adekvatnim,

kompetitivnim i usporedivim onima iz životinjskih izvora kao što je npr. jaje (Barbeau i Kinsella, 1988). Nadalje, nekoliko studija je dokazalo razna blagotvorna svojstva bioaktivnih peptida sadržanih u RuBisCO-u neka od kojih su antihipertenzivno, antidijabetičko, protuupalno, opuštajuće i antimikrobno (DiStefano i sur., 2018). Kapel i sur. (2006) su u svojoj studiji demonstrirali *in vitro* inhibiciju ACE enzima, odgovornog za vazokonstrikciju, upotrebom hidroliziranog koncentrata bijele frakcije proteina (RuBisCO činio 65 % proteinskog sastava) izoliranog iz lišća lucerne. Primjenom navedenog hidroliziranog koncentrata uspješno su smanjili sistolički tlak spontano hipertenzivnim štakorima za 29,9 mmHg tijekom 4 sata nakon oralne primjene u količini od 500 mg/kg tjelesne mase štakora. Peptid rubiscolin-6 izoliran iz lišća špinata je u jednoj studiji samostalno prouzročio anskiolitički (opuštajući) učinak indirektnim djelovanjem na mehanizam otpuštanja dopamina, često nazivanog i hormonom sreće (Sayin, 2019; Hirata i sur., 2007). Hidrolizat RuBisCO-a 90 %-tne čistoće je pokazao snažnu *in vitro* antioksidativnu aktivnost inhibirajući oksidaciju linolenske masne kiseline (Kobbi i sur., 2017). Također, Bondu i sur. (2015) su primijetili kako većina antioksidativnih peptida dobivenih hidrolizacijom proteinskih frakcija crvene alge, *Soliera chordalis*, potječu upravo od RuBisCO-a. Trovaslet i sur. (2007) su dokazali djelomičnu bakteriostatičnu aktivnost izolirane i hidrolizirane male podjedinice RuBisCO-a na odabrane patogene gram negativne bakterije (*Salmonella arizonae* i *Shigella sonnei*) no promjer zone inhibicije je iznosio do 10 mm što ukazuje na potrebu dodatnog pročišćavanja ispitivane frakcije kako bi se povećala antimikrobna aktivnost. Osim nutritivnih i nutraceutičkih djelovanja, RuBisCO posjeduje i poželjna tehnološko-funkcionalna svojstva poput geliranja, pjenjena i emulgiranja (DiStefano, 2018). Martin i sur. (2014) su u svojoj studiji karakterizirali reološka svojstva toplinom izazvanih gelova RuBisCO-a pri čemu je geliranje zabilježeno već pri niskoj koncentraciji od 2,5 % te se gel razvio brže u odnosu na uspoređene komercijalne proteine. Također, primijetili su kako se gelovi RuBisCO-a formiraju na temelju nekovalentnih interakcija tijekom denaturacije proteina što dovodi do njihove lake lomljivosti i bržeg raspadanja. Unatoč tome, RuBisCO može pronaći primjenu u razvoju gelova s niskim udjelom šećera pošto se rasipanjem gela povećava kontaktna površina između gela i okusnih receptora u ustima što posljedično dovodi do povećane percepcije okusa (DiStefano i sur. 2018; Sala i Stieger, 2013). Emulgirajuća svojstva proteina uvelike ovise o predtretmanu i metodama pročišćavanja pa je tako koncentrat RuBisCO-a, sušen raspršivanjem pri 85 °C, iz lista lucerne pokazao bolja emulgirajuća svojstva u odnosu na izolat proteina soje što nije bilo jednako i za RuBisCO izoliran iz lista špinata koji nije podlegao takvom predtretmanu (De jong i Nieuwland, 2011). Pri povoljnim uvjetima (pH izoelektrične točke, koja za RuBisCO iznosi 4,4 - 4,7, pri čemu se elektrostatske interakcije svode na nulu) pjena formirana upotrebom RuBisCO-a zauzimala je isti volumen kao i ona

dobivena upotrebom proteina iz bjelanjaka jajeta te je pokazala i bolju stabilnost tijekom perioda od 2 sata (De Jong i Nieuwland, 2011).

Osim povoljnog proteinskog sastava, lišće šećerne repe se, zbog same biologije biljnih stanica, odlikuje i visokim sadržajem strukturalnih ugljikohidrata u suhoj tvari koji su sastavni dio staničnih stijenki. Većinu strukturalnih ugljikohidrata čine celuloza, hemiceluloza i pektin, dok je lignin prisutan u malim količinama (Rule i sur., 1991). Stoga je lišće šećerne repe moguće razmatrati i kao potencijalnu sirovinu za održivu proizvodnju bioetanola koja odgovara pravilima cirkularne ekonomije (Zacari i sur., 2019). Da bi se lišće šećerne repe moglo iskoristiti kao potencijalna sirovina za proizvodnju bioetanola potrebno je doprijeti do jednostavnih šećera, građevnih jedinica strukturalnih ugljikohidrata. Procesom enzimatske hidrolize moguće je depolimerizirati ove ugljikohidrate do topljivih šećera koje kvasci i ostale fermentabilne mikrobne kulture mogu metabolizirati u alkohol. Aramrueang i sur. (2017) su postigli konverziju strukturalnih ugljikohidrata lišća šećerne repe u jednostavnije šećere u iznosu od najviše 82 % nakon 72 h enzimatske hidrolize simultanom upotrebom tri različita enzimskih preparata (CTec2, HTec2 i Pectinex Ultra SPL) što dokazuje mogućnost primjene lista šećerne repe kao sirovine za potrebe biorafinerija uz upotrebu adekvatnih enzimskih preparata.

Biljke sadrže fenolne spojeve koji se odlikuju antioksidativnom aktivnošću, a raspodijeljeni su u različitim biljnim tkivima što, između ostaloga, uvjetuje i njihovu zastupljenost (Pabon-Baquero i sur., 2018). Na temu ekstrakcije i karakterizacije bioaktivnih komponenata sadržanih u lišću šećerne repe postoji relativno malo studija (Maravić i sur., 2022). Prema El-Gengaihi i sur. (2016) lišće šećerne repe sadrži visoke količine galne (344 µg/mL) i ferulinske kiseline (89,7 µg/mL) dok su cinaminska i kafeinska kiselina te katehin zastupljeni u malim količinama. Maravić i sur. (2022) su u svojem istraživanju usporedili utjecaj pet različitih tehnika ekstrakcije na prinos polifenolnih spojeva iz lišća šećerne repe pri čemu je ukupni prinos ekstrakcije varirao u rasponu 18,21 – 37,04 % te su zamijetili kako je individualni polifenolni profil ekstrakata varirao ovisno o primijenjenoj metodi ekstrakcije. Također, viteksin se pokazao kao najzastupljeniji fenolni spoj u svakom dobivenom ekstraktu.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

Ekperimentalni dio proveden je u tri faze. Prva faza obuhvaćala je provedbu zasebnih toplinskih i ultrazvukom potpomognutih ekstrakcija iz usitnjenih peleta dobivenih sušenjem pulpe zaostale nakon prešanja soka iz svježeg lišća šećerne repe. U drugoj fazi određivali su se fizikalno-kemijski parametri dobivenih ekstrakata te prinosi proteina i bioaktivnih spojeva prema odabranim analitičkim metodama. U trećoj fazi su se dobiveni podaci statistički obradili u svrhu donošenja ukupnog zaključka o razlikama između provedenih metoda ekstrakcije.

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Suhi peleti lišća šećerne repe

Istraživanje je provedeno na peletima lišća šećerne repe dobivenim od projektnih partnera iz Turske (slika 1). Peleti su usitnjeni na veličinu čestica u rasponu 1-2 mm u svrhu dobivanja veće aktivne površine čime se povećava efikasnost ekstrakcije. Za svaki uzorak peleti su vagani u lađicama sklopljenim od papira i preneseni u posebnu laboratorijsku čašu s dvostrukom stijenkom za potrebe ultrazvučne ekstrakcije odnosno u obične laboratorijske čaše za potrebe toplinske ekstrakcije. Nakon što je uzorak prenesen u određenu laboratorijsku čašu ulijevalo se jedno od tri ekstrakcijska otapala: deionizirana voda, 25 %-tna otopina etanola ili 50 %-tna otopina etanola. Ukupno je pripremljeno 36 uzoraka od kojih je 27 podvrgnuto ultrazvučnoj ekstrakciji, a 9 toplinskoj ekstrakciji.



**Slika 1.** Usitnjeni uzorak osušenih peleta (vlastita fotografija)



### 3.1.2. Kemikalije

- Deionizirana voda (PBF, Zagreb, Hrvatska)
- 0,1 M otopina natrijeva hidroksida (NaOH) koja se pripremi na sljedeći način: odvaži se 0,8000 g NaOH (Lach-Ner, Neratovice, Češka) te se kvantitativno prenese preko lijevka u odmjernu tikvicu od 200 mL koja se zatim nadopuni deioniziranom vodom do oznake i promiješa
- Reagens A (2 %-tni  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 0,1 M NaOH) koji se priprema na sljedeći način: odvaži se 4,0000 g bezvodnog natrijevog karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (K.T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska) koji se kvantitativno preko lijevka prenese u odmjernu tikvicu od 200 mL koja se zatim do oznake nadopuni 0,1 M otopinom NaOH i promiješa
- 1 %-tna otopina kalij natrijevog tartarata ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ) koja se pripremi na sljedeći način: odvaži se 0,0800 g K,Na-tartarata (Lach-Ner, Neratovice, Češka) i kvantitativno preko lijevka prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL koja se zatim nadopuni deioniziranom vodom do oznake i promiješa
- Reagens B (0,5 %-tni  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  u 1 %-tnom K,Na-tartaratu) koji se priprema na sljedeći način: odvaži se 1,000 g bakrovog (II) sulfata pentahidrata ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) (Lach-ner, Neratovice, Češka) koji se kvantitativno preko lijevka prenese u odmjernu tikvicu od 200 mL koja se zatim nadopuni do oznake 1 %-tnom otopinom K,Na-tartarata
- Reagens C koji se pripremi na sljedeći način: reagens A i reagens B pomiješaju se u omjeru 50:1
- Galna kiselina standard (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- Standard goveđeg serumskog albumina (*eng. Bovine serum albumine*, BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- 1 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) koja se pripremi na sljedeći način: odvaži se 0,025 g Troloxa (Acros Organics, Geel, Belgija), odvaga se zatim preko lijevka kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL nakon čega se nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom
- 0,1 mM otopina 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH) koja se priprema na sljedeći način: odvaži se 0,004 g DPPH (ABCR, Karlsruhe, Njemačka) te kvantitativno preko lijevka prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se zatim 100 %-tnim metanolom nadopuni do oznake
- Metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Standard 1 mM otopina željezo (II)-sulfat heptahidrat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) koji se priprema na sljedeći način: odvaži se 0,139 g željezo (II)-sulfat heptahidrata (Honeywell Fluka, Seelze, Njemačka) u plastičnoj ladici za vaganje i kvantitativno prenese s destiliranom

- vodom u odmjernu tikvicu volumena 500 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake
- 40 mM vodena otopina klorovodične kiseline (HCl) (Carlos Erba reagents, Val-de-Reuil, Francuska) koja se priprema na sljedeći način: 330  $\mu$ L 12 M HCl (konc. HCl = 37 %) razrijedi se u odmjernoj tikvici od 100 mL destiliranom vodom te nadopuni do oznake.
  - 10 mM otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) koja se priprema na sljedeći način: 0,0312 g TPTZ (ACROSS ORGANICS, Geel, Belgija) otopi se u odmjernoj tikvici od 10 mL sa 40 mM HCl te se istom klorovodičnom kiselinom nadopuni do oznake.
  - 20 mM otopina željezovog(III)-klorida ( $\text{FeCl}_3$ ) koja se priprema na sljedeći način: 0,0541 g  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  (GRAM MOL, Zagreb, Hrvatska) otopi se u 10 mL destilirane vode.
  - Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
  - 0,3 M acetatni pufer koji se pripremi na sljedeći način: otapanjem 1,55 g natrijev acetata trihidrata ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) (GRAM MOL, Zagreb, Hrvatska) s 8 mL ledene octene kiseline ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (J.T. Baker, Gliwice, Poljska) u odmjernoj tikvici od 500 mL koja se zatim nadopuni deioniziranom vodom do oznake.
  - 25 %-tna otopina etanola (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
  - 50 %-tna otopina etanola (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
  - 7,5 %-tna otopina  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  koja se priprema na sljedeći način: odvaži se 7,5 g natrijeva karbonata (K.T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska) te se preko lijevka kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se zatim do oznake nadopuni deioniziranom vodom.
  - FRAP reagens koji se priprema na sljedeći način: prema predviđenoj količini reagensa pripremljeni acetatni pufer, 10 mM otopina TPTZ reagensa i 20 mM otopina  $\text{FeCl}_3$  pomiješaju se u omjeru od 10:1:1.

### 3.1.3. Uređaji

- Analitička vaga NBL-254i Nimbus (Adam Equipment Inc., Oxford, SAD)
- pH-EC metar HI5521-02 (Hanna Instruments Inc., Zagreb, Hrvatska)
- Ultrazvučni uređaj Q700 Sonicator (Qsonica, Newtown, SAD)
- Recirkulirajući rashladni uređaj 4905 Sonicator (Qsonica, Newtown, SAD)
- UV-Vis spektrofotometar UV-2600i s programskom podrškom LabSolutions UV-Vis (Shimadzu, Kyoto, Japan)
- Vakuumpumpa Rocker 300 (Witeg, Werheim, Njemačka)
- Vortex uređaj MX-S (Dlab, Peking, Kina)
- Tehnička vaga Highland HCB 1002 (Adam Equipment, Milton Keynes, UK)
- Testna (klima) komora UN75 (Mettler GmbH, Schwabach, Njemačka)

- Vodena kupelj s funkcijom miješanja (Memmert GmbH, Schwabach, Njemačka)

#### 3.1.4. Pribor

- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Stakleni lijevci (mali i veliki)
- Staklena kapaljka
- Propipeta za kapaljku
- Odmjerne tikvice (10 mL, 100 mL, 200 mL, 500 mL)
- Staklene čaše (250 mL)
- Automatska pipeta Gilson (0,2 mL, 1 mL, 5 mL)
- Plastične Falcon epruvete (50 mL, 15 mL)
- Plastične „lađice“
- Laboratorijska žlica
- Špatula
- Menzura (100 mL)
- Odsisna boca
- Büchnerov lijevak
- Filter papir
- Plastične kivete
- Plastične posude
- Eksikator

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Ekstrakcija primjenom ultrazvuka visokog intenziteta

Eksperimentalni parametri primjene ultrazvuka visokog intenziteta dizajnirani su na platformi STATGRAPHICS Centurion (Statgraphics Technologies Inc., Virginia, SAD) pri čemu su definirane varijacije u parametrima određene prethodnim eksperimentalnim saznanjima. Nazivi ultrazvukom tretiranih uzoraka vezani uz pripadajuće parametre ekstrakcije prikazani su u tablici 1. U ekstrakcijama su upotrijebljena sljedeća otapala: redestilirana voda (0 % etanola), 25 %-tna otopina etanola i 50 %-tna otopina etanola.

**Tablica 1.** Oznake uzoraka tretiranih ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom uz pripadajuće parametre procesa

Uzorak	Amplituda (%)	Vrijeme tretmana (min)	Udio etanola (%)	Masa (g)
UP1	50	6	25	2
UP2	100	3	25	2
UP3	50	9	0	2
UP4	75	3	25	2
UP5	75	6	50	2,01
UP6	100	3	50	2
UP7	50	3	0	2,01
UP8	100	3	0	2
UP9	75	9	50	2
UP10	50	3	50	2
UP11	100	9	25	2,01
UP12	100	6	0	2,01
UP13	100	6	25	2,01
UP14	75	6	0	2
UP15	50	3	25	2,01
UP16	50	6	50	2
UP17	50	9	25	2,01
UP18	100	9	0	2,01
UP19	50	9	50	2
UP20	75	9	0	2
UP21	75	6	25	2
UP22	75	3	0	2
UP23	75	9	25	2
UP24	100	9	50	2
UP25	50	6	0	2,01
UP26	100	6	50	2
UP27	75	3	50	2

### 3.2.1.1. Postupak provođenja ekstrakcije primjenom ultrazvuka visokog intenziteta

Na tehničkoj vagi odvaži se 2 g usitnjenog uzorka s točnošću  $\pm 0,01$  g i prenese u specijaliziranu laboratorijsku čašu s dvostrukom stijenkom koja se nalazi u kućištu ultrazvučnog

uređaja. Laboratorijska čaša posjeduje dvostruku stijenku preko koje se hladi pomoću deionizirane vode koju uređaj za hlađenje, smješten s vanjske strane ultrazvučnog kućišta, konstantno cirkulira i hladi. Svrha takve konfiguracije je osiguravanje reakcijske smjese od pregrijavanja, koje može nastati prilikom primjene ultrazvuka visokog intenziteta zbog velike energije i topline koja se oslobađa prilikom fenomena kavitacije, a kako bi se zadržao netoplinski integritet procesa (temperatura ne prelazi 30 do 35 °C). U specijaliziranu laboratorijsku čašu, u kojoj se sada nalazi uzorak, se prema planu eksperimenta (tablica 1) ulije 100 mL odgovarajućeg ekstrakcijskog otapala. Zatim se ultrazvučna sonda uroni otprilike u središte reakcijske smjese te se uroni termočlanak tako da ne dodiruje sondu i stijenke čaše. Kućište se zatvori zvučno izoliranim vratima te se na zaslonu upravljačke jedinice uređaja postave zadani parametri amplitude i trajanja tretmana i pritisne tipka „*START*“ za početak ekstrakcije. Nakon završene ekstrakcije reakcijska smjesa se filtrira preko Büchnerovog lijevka pomoću vakuum pumpe. Nakon filtracije dio dobivenog ekstrakta odvoji se u 3 Eppendorf epruvete koje se odmah stave u zamrzivač na hlađenje do provedbe planiranih kemijskih analiza, a drugi dio ekstrakta se prelije u 2 Falcon epruvete u koje se uroni pH metar za potrebe analiziranja fizikalnih parametara (pH vrijednost i električna provodnost) u paraleli.

### 3.2.2. Toplinska ekstrakcija

Toplinska ekstrakcija provedena je u vodenoj kupelji pri 60 °C uz automatsku kontrolu temperature i uključenu funkciju miješanja pri 150 o/min. Ukupno je pripremljeno 9 uzoraka s različitim parametrima ekstrakcije. Uzorci su označeni s pripadajućim parametrima vremena trajanja tretmana i udjela etanola u korištenom otapalu. Oznake uzoraka i parametri ekstrakcije prikazani su u tablici 2.

**Tablica 2.** Oznake uzoraka tretiranih procesom toplinske ekstrakcije uz pripadajuće parametre procesa

Uzorak	Vrijeme tretmana (min)	Udio etanola (%)	Masa (g)
TPE 0/3	3	0	2,01
TPE 0/6	6	0	2
TPE 0/9	9	0	2
TPE 25/3	3	25	2,01
TPE 25/6	6	25	2,01
TPE 25/9	9	25	2
TPE 50/3	3	50	2,01
TPE 50/6	6	50	2
TPE 50/9	9	50	2,01

### 3.2.2.1. Postupak provođenja toplinske ekstrakcije

Uzorci su izvagani na isti način kao i za potrebe ultrazvučne ekstrakcije, a reakcijske smjese pripremljene u laboratorijskim čašama od 250 mL prema planu eksperimenta prikazanom u tablici. Pritom je količina korištenog otapala također iznosila 100 mL kao i u slučaju ultrazvučne ekstrakcije. Laboratorijske čaše s reakcijskim smjesama postavljene su u kupelj u 3 serije po 3. Pritom su u svakoj seriji bili prisutni uzorci s istim otapalom, ali različitim vremenom tretmana kako bi se dobilo vrijeme potrebno za manipulaciju pošto je filtraciju ekstrakta poželjno izvršiti odmah po završetku vremena ekstrakcije. Nakon što je u uzorcima postignuta temperatura od 60 °C otpočeto je mjerenje vremena ekstrakcije. Po završetku definiranog vremena tretmana za svaki uzorak provedena je filtracija ekstrakta na isti način kao što je prethodno opisano za uzorke tretirane ultrazvukom visokog intenziteta. Uzorci su zatim na isti način, opisan kod postupka ultrazvučne ekstrakcije, raspoređeni u predviđene Eppendorf epruvete, koje su stavljene u zamrzivač, te u Falcon epruvete za mjerenje fizikalnih parametara u paraleli u svrhu dobivanja ujednačenog rezultata.

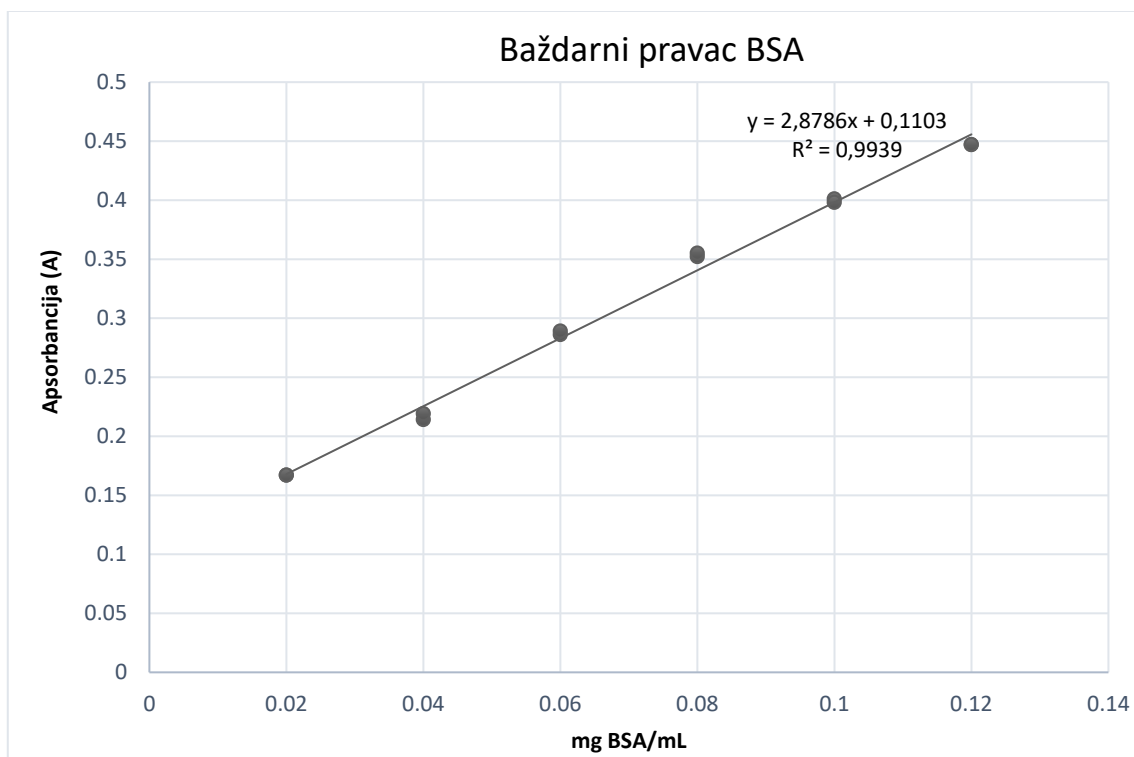
### 3.2.3. Određivanje ukupnih proteina po Lowryju

Metoda po Lowryju je jednostavna kolorimetrijska metoda za određivanje ukupnih proteina u analiziranom uzorku. Zasniva se na reakciji bakrovih dvovalentnih kationa s peptidnim vezama proteina u lužnatoj sredini. Navedeni kationi se pritom reduciraju i formiraju  $\text{Cu}^+$ -protein kompleks. Dodavanjem Folin-Ciocalteu reagensa u smjesu dolazi do njegove reakcije s  $\text{Cu}^+$ -protein kompleksom pri čemu se razvija plavo obojenje čiji se intenzitet mjeri na spektrofotometru pri valnoj duljini od 740 nm. Izmjerena apsorbancija proporcionalna je intenzitetu obojenja koje je proporcionalno koncentraciji proteina u uzorku odnosno apsorbancija je proporcionalna koncentraciji proteina (Subroto i sur., 2020).

#### 3.2.3.1. Izrada baždarnog dijagrama

Za precizno određivanje koncentracije ukupnih proteina u uzorku prvo je potrebno izraditi baždarni dijagram pomoću kojeg se određuje ovisnost izmjerene apsorbancije o poznatoj koncentraciji standarda goveđeg serumskog albumina (eng. *Bovine serum albumine*, BSA). Za potrebe konstruiranja baždarnog dijagrama pripremljene su standardne vodene otopine BSA sljedećih koncentracija: 0,02 mg/mL; 0,04 mg/mL; 0,06 mg/mL; 0,08 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,12 mg/mL. Postupak provođenja metode (opisan u potpoglavlju 3.2.3.2. s time da se prilikom izrade baždarnog dijagrama u pripremi reakcijske smjese koriste pripremljene otopine standarda umjesto uzorka) se provede za svaku pripremljenu koncentraciju standarda te se na

spektrofotometru izmjere apsorbancije pri 740 nm. Pomoću izmjerenih vrijednosti apsorbancije i poznatih koncentracija vodenih otopina BSA standarda konstruira se baždarni dijagram pri čemu vrijednosti apsorbancije čine os ordinatu, a koncentracije standarda os apscisu (slika 2).



**Slika 2.** Baždarni pravac za metodu određivanja ukupnih proteina po Lowryju

Jednadžba baždarnog pravca glasi:

$$y = 2,8786x + 0,1103 \quad [1]$$

$$R^2 = 0,9939$$

gdje je y apsorbancija izmjerena pri 740 nm, x koncentracija proteina (mg BSA/mL), a  $R^2$  koeficijent determinacije.

### 3.2.3.2. Postupak provođenja metode po Lowryju

U staklenu epruvetu automatskom pipetom se otpipetira 0,4 mL razrijeđenog uzorka ekstrakta, i 2 mL reagensa C te se dobivena smjesa vortexira i ostavi u mraku pri sobnoj temperaturi tijekom 10-15 minuta kako bi došlo do odvijanja kemijske reakcije. Zatim se u reakcijsku smjesu automatskom pipetom naglo doda 0,2 mL Folin-Ciocalteu reagensa (komercijalni reagens razrijeđen destiliranom vodom u omjeru 1:2) uz snažno vortexiranje. Dobivena smjesa se zatim ostavi na sobnoj temperaturi u mraku tijekom 40-60 minuta kako bi

se odvila završna reakcija i razvilo obojenje. Mjerenja apsorbancije provedena su na UV-Vis spektrofotometru UV-2600i. Potrebno je pripremiti i slijepu probu u koju se umjesto uzorka dodaje jednaka količina ekstrakcijskog otapala ovisno o uzorku koji se analizira, a svi ostali sastojci reakcijske smjese su jednaki kao i za analizu uzoraka. Izmjerene vrijednosti apsorbancije analiziraju se pomoću programa LabSolutions™ UV-Vis. Mjerenje apsorbancije za sve uzorke provodi se u paraleli kako bi se dobila aritmetička sredina i ujednačen rezultat. Iz izmjerene apsorbancije izračuna se koncentracija proteina u uzorku preko jednadžbe baždarnog pravca pomoću koje se dalje izračuna količina proteina u svakom uzorku s obzirom na suhu tvar peleta (mg BSA/g s.tv.).

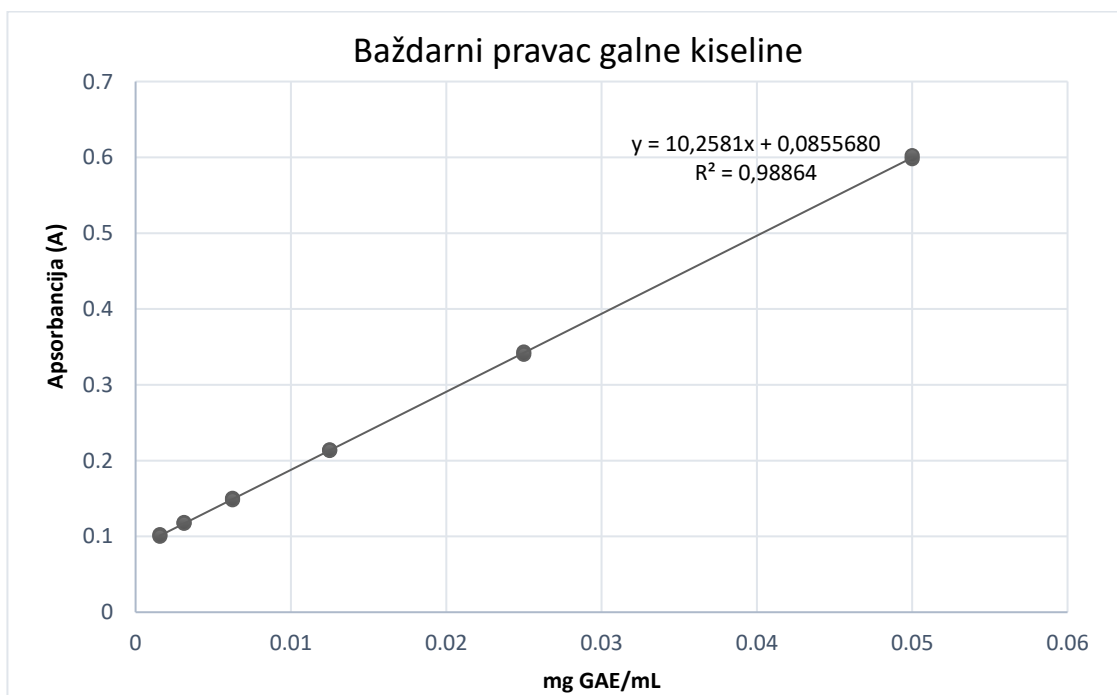
### 3.2.4. Određivanje koncentracije ukupnih fenola

Za određivanje koncentracije ukupnih fenola primjenjena je Folin-Ciocalteu metoda koja nalazi čestu primjenu u analizama ukupnih fenola. Temelji se na reakciji između Folin-Ciocalteu reagensa (smjesa fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline) i reducirajućeg spoja, u ovom slučaju fenola. Pritom dolazi do redukcije kiselinskih kompleksa u Folin-Ciocalteu reagensu do plavo obojenih volframovih i molibdenovih oksida. Navedena reakcija je kolorimetrijska odnosno intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm. Intenzitet obojenja je direktno proporcionalan koncentraciji fenola u analiziranom uzorku (Singleton i Rossi, 1965).

#### 3.2.4.1. Izrada baždarnog dijagrama

Za potrebe određivanja nepoznate koncentracije ukupnih fenola u uzorku potrebno je izraditi baždarni dijagram na temelju poznatih koncentracija pripremljenih standardnih otopina. Standardne otopine se pripreme razrijeđenjem primarne 10 %-tne otopine galne kiseline. Koncentracije pripremljenih standardnih otopina su: 0,05 mg/mL; 0,025 mg/mL; 0,0125 mg/mL; 0,00625 mg/mL; 0,003125 mg/mL te 0,0015625 mg/mL. Postupak reakcije s Folin-Ciocalteu reagensom je opisan u potpoglavlju 3.2.4.2. s time da se za potrebe izrade baždarnog dijagrama u reakcijsku smjesu dodaje otopina standarda umjesto uzorka. Na osnovu izmjerenih vrijednosti apsorbancije (y-os) i poznatih koncentracija otopina galne kiseline (x-os) izradi se baždarni pravac (slika 3) u programu Microsoft Excel. Prema formuli baždarnog pravca izračunavaju se nepoznate koncentracije ukupnih fenola u uzorcima koje se izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline (mg GAE/g s.tv.).





**Slika 3.** Baždarni pravac za metodu određivanja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom

Dobivena jednačba pravca glasi:

$$y = 10.2581x + 0,0855680 \quad [2]$$

$$R^2 = 0,98864$$

gdje je  $y$  vrijednost apsorbancije pri 765 nm,  $x$  koncentracija galne kiseline (mg/mL) ,  $R^2$  koeficijent determinacije

#### 3.2.4.2. Postupak provođenja metode određivanja koncentracije ukupnih fenola

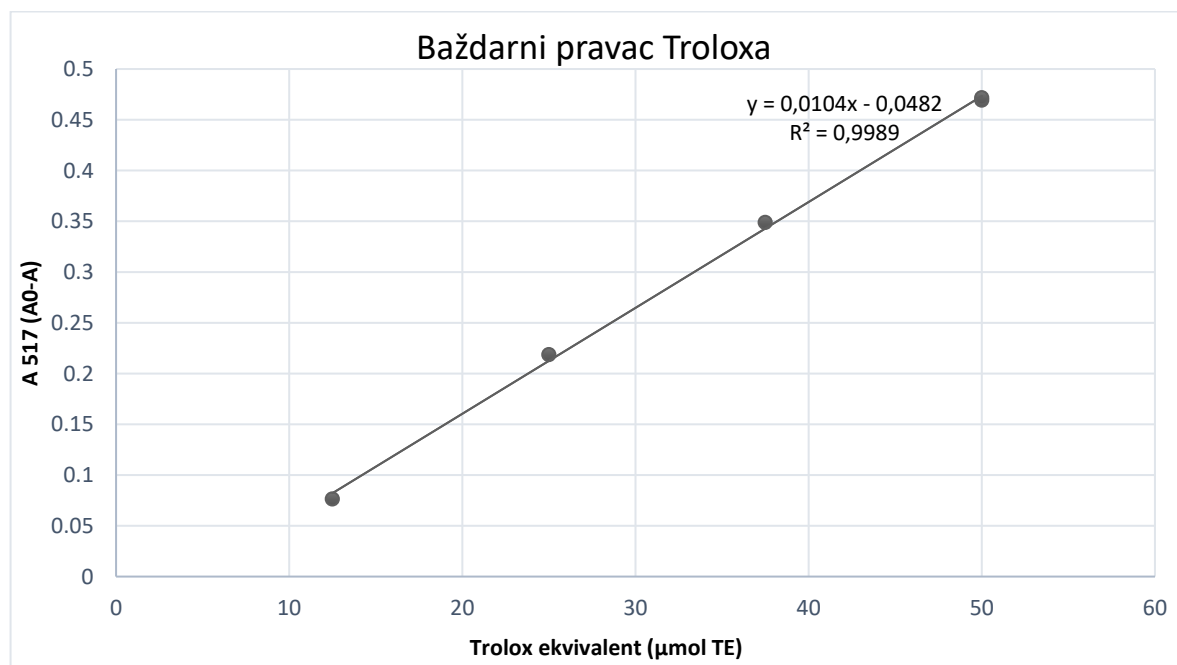
U staklenu epruvetu otpipetira se 1 mL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog s deioniziranom vodom u omjeru 1:9), 0,2 mL uzorka i 0,8 mL 7,5 % otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Pripremljene reakcijske smjese se vortexiraju da bi se osigurala pouzdana reakcija i razvoj boje. Uzorci se čuvaju na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi tijekom 2 sata nakon čega se mjeri apsorbancija odnosno intenzitet nastalog obojenja na UV-Vis spektrofotometru UV-2600i na valnoj duljini od 765 nm. Određivanju apsorbancije reakcijskih smjesa s uzorcima prethodi baždarenje spektrofotometra slijepom probom pri čemu je reakcijska smjesa ista osim što se umjesto uzorka otpipetira jednaka količina deionizirane vode. Svim uzorcima apsorbancije se izmjere u paraleli te se dobije srednja vrijednost kako bi ukupni rezultat bio precizniji. Srednja vrijednost apsorbancije za svaki uzorak se uvrsti u jednačbu baždarnog pravca putem koje se izračuna koncentracija koja se u obliku krajnjeg rezultata izražava kao ekvivalent galne kiseline u suhoj tvari peleta (mg GAE/g s.tv.).

### 3.2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

DPPH metoda široko korištena metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti u raznim tipovima ekstrakata i smjesa. DPPH (2,2,-difenil-1-pikrilhidrazil) je stabilan slobodni radikal duboko ljubičaste boje. U prisustvu antioksidansa dolazi do doniranja elektrona odnosno vodikova atoma s antioksidansa na DPPH pri čemu se DPPH reducira u DPPH-H što dovodi do promjene boje reakcijske smjese u žutu. Intenzitet promjene boje je u stehiometrijskom odnosu s antioksidativnom aktivnošću analiziranog uzorka (Brand-Williams i sur., 1995). Apsorbancija otopine se mjeri spektrofotometrijski na valnoj duljini od 517 nm pri čemu je apsorbancija uvrštena u jednadžbu pravca jednaka razlici između apsorbancije slijepe probe i apsorbancije uzorka ( $A_0 - A_{uzorak}$ ).

#### 3.2.5.1. Izrada baždarnog dijagrama

Iz početne 1 mM otopine Troloxa pripreme se razrijeđenja u slijedećim koncentracijama: 12,5  $\mu\text{M}$ ; 25  $\mu\text{M}$ ; 37,5  $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$ . Priprema reakcijske smjese i slijepe probe opisana je u potpoglavlju 3.2.5.2. Jedina razlika je u korištenju otopine Troloxa umjesto otopine uzorka. Na temelju izmjerenih apsorbancija i poznatih koncentracija standardnih otopina Troloxa izradi se baždarni pravac (slika 4) pomoću programa Microsoft Excel gdje se na ordinati nalaze vrijednosti izmjerenih apsorbancija pri valnoj duljini od 517 nm, a na apscisi koncentracije otopina Troloxa.



**Slika 4.** Baždarni pravac za mjerenje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

Jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0104x - 0,0482 \quad [3]$$

$$R^2 = 0,9989$$

gdje je  $y$  razlika apsorbancije slijepe probe ( $A_0$ ) i otopine Troloxa ( $A$ ) pri 517 nm,  $x$  koncentracija Trolox ekvivalenta ( $\mu\text{mol TE}$ ),  $R^2$  koeficijent determinacije.

### 3.2.5.2. Postupak mjerenja antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

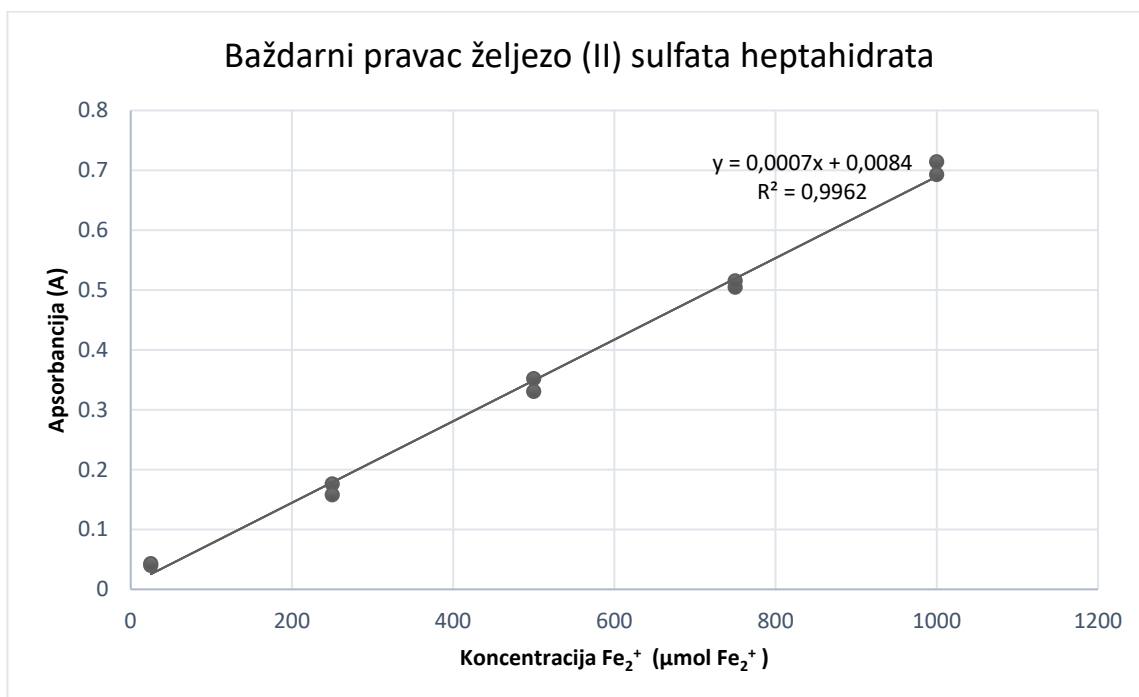
Najprije se pripremi uzorak tako da se 10 mL uzorka centrifugira 10 min pri 7830 rpm i po potrebi razrijedi s ekstrakcijskim otapalom. Postupak se provodi prema metodi Shortle i sur. (2014) uz modifikacije. U staklenu epruvetu otpipetira se 0,75 mL uzorka i 1,5 mL 0,1 mM otopine DPPH. Za slijepu probu se umjesto uzorka koristi jednaka količina 100 %-tnog metanola. Epruvete s tako pripremljenim reakcijskim smjesama stoje u mraku pri sobnoj temperaturi tijekom 20 min nakon čega se mjeri apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 517 nm.

### 3.2.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Metoda se temelji na antioksidativnoj sposobnosti analiziranog uzorka da reducira  $\text{Fe}^{3+}$  ione u  $\text{Fe}^{2+}$  ione pri čemu žuto obojeni kompleks TPTZ (željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazin) reagira s prisutnim antioksidansima što rezultira nastankom plavo obojenog produkta. Reakcija se odvija u kiselom mediju kako bi se održala dobra topljivost željeza. Intenzitet nastalog obojenja je proporcionalan antioksidativnoj aktivnosti uzorka (Munteanu i Apetrei, 2021). Apsorbancija se mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 593 nm. Rezultati se izražavaju kao  $\mu\text{mol Fe}^{2+}$  ekvivalenta po gramu suhe tvari uzorka.

#### 3.2.6.1. Izrada baždarnog dijagrama

Za izradu baždarnog pravca potrebno je 100 mL 1mM otopine željezo(II)sulfata heptahidrata. Iz 1 mM otopine željezo(II) sulfata heptahidrata pripreme se slijedeća razrijeđenja: 25, 250, 500, 750 i 1000  $\mu\text{M}$ . Postupak pripreme reakcijskih otopina jednak je kao što je opisano u potpoglavlju 3.2.6.2. Pomoću izmjerenih vrijednosti apsorbancija i poznatih koncentracija standardnih otopina u programu Microsoft Excel se izradi baždarni pravac (slika 5).



**Slika 5.** Baždarni pravac za mjerenje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom

Jednadžba baždarnog pravca glasi:

$$y = 0,0007x + 0,0084 \quad [4]$$

$$R^2 = 0,9962$$

gdje je y vrijednost izmjerene apsorbancije, x koncentracija u ekvivalentima Fe<sup>2+</sup> (µmol Fe<sup>2+</sup>), R<sup>2</sup> koeficijent determinacije.

### 3.2.6.2. Postupak mjerenja antioksidativne aktivnosti FRAP metodom

U staklene epruvete redom se otpipetira 240 µL deionizirane vode, 80 µL uzorka i 2080 µL FRAP reagensa. Pripremljene reakcijske otopine se zatim vortexiraju i stave temperirati pri 37 °C tijekom 5 min. U reakcijsku otopinu slijepe probe se umjesto uzorka otpipetira jednaka količina odgovarajućeg ekstrakcijskog otapala. Nakon temperiranja provodi se mjerenje apsorbancije na spektrofotometru pri valnoj duljini od 595 nm. Uvrštavanjem očitane apsorbancije u jednadžbu baždarnog pravca izračuna se antioksidativna aktivnost u analiziranim uzorcima i preračuna na suhu tvar uzorka (µmol Fe<sup>2+</sup>/g s.tv.)

### 3.2.7. Određivanje ukupne suhe tvari sušenjem

Staklene posudice, predviđene za držanje materijala tijekom sušenja, se najprije osuše u klima komori pri 105 °C kako bi se uklonila vlaga koja bi inače ometala preciznost procesa. Nakon sušenja posudice se stave hladiti u eksikatoru tijekom 20 minuta. Potom im se izmjeri

masa s preciznošću od  $\pm 0,0002$  g. U ohlađene i izvagane posudice prenese se približno 2,5 g uzorka te se tako pripremljene posudice s uzorcima vraćaju u komoru za sušenje pri  $105\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  u trajanju od jednog sata. Nakon toga posudice s uzorkom se stave na hlađenje u eksikator tijekom 20 min prije nego im se ponovno izmjeri masa. Postupak se ponavlja sve dok razlika u masi između dva uzastopna sušenja u razmaku od pola sata ne bude manja od 0,001 g. Udio suhe tvari se zatim iz dobivenih podataka, o masi uzorka prije i nakon sušenja, izračuna putem jednadžbe [5]:

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

Pri čemu je:

$m_0$  – masa prazne staklene posudice

$m_1$  – masa posudice s uzorkom prije sušenja

$m_2$  – masa posudice s uzorkom nakon sušenja

### 3.2.8. Određivanje električne provodnosti i pH vrijednosti

Električna provodnost (G) i pH vrijednost dobivenih ekstrakata izmjerene su neposredno nakon ekstrakcije upotrebom kombiniranog pH-EC mjernog instrumenta HI5521-02 (Hanna Instruments Inc., Zagreb, Hrvatska). Mjerenja su provedena u paraleli kako bi se dobila srednja vrijednost i samim time precizniji konačni rezultat.

### 3.2.9. Obrada podataka

Dobivene vrijednosti električne provodnosti, pH te vrijednosti ukupnih fenola, ukupnih proteina i antioksidacijske aktivnosti ekstrakata dobivene nakon provedenih toplinskih i ekstrakcija potpomognutih ultrazvukom obrađene su u statističkom programu STATGRAPHICS Centurion (Statgraphics Technologies Inc., Virginia, SAD). Pritom je korišten faktorijalni dizajn s više razina utjecaja što daje uvid u mogući međusoban utjecaj ulaznih (nezavisnih) varijabli na izlazne (zavisne) varijable. Ulazni parametri za provedeni eksperiment toplinske ekstrakcije su udio etanola u otapalu i vrijeme tretiranja dok izlazne varijable predstavljaju dobivene vrijednosti električne provodnosti, pH, ukupnih fenola i proteina te antioksidativne aktivnosti tretiranih uzoraka. Za potrebe statističke obrade podataka dobivenih analizom uzoraka koji su podvrgnuti ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta definirane ulazne varijable uključuju: amplitudu, vrijeme tretiranja i udio etanola u otapalu. Izlazne varijable u statističkoj obradi podataka dobivenih analizom uzoraka podvrgnutih ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom visokog intenziteta su jednake kao i u slučaju statističke obrade podataka toplinske ekstrakcije. Pomoću istog statističkog programa provedena je i multivarijatna analiza varijance (MANOVA, engl. *Multivariate analysis of variance*) kojom se analizirala statistička značajnost

utjecaja interakcije mogućih kombinacija dvaju ulaznih varijabli i kvadratne interakcije pojedinačnih ulaznih varijabli na vrijednost definiranih izlaznih varijabli. Pritom parametri imaju statistički značajan utjecaj u slučaju da izračunata  $p$ -vrijednost iznosi  $< 0,05$  što opisuje kako se takvi parametri značajno razlikuju od nule u 95 %-tnom intervalu pouzdanosti.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Provedeno istraživanje je za cilj imalo usporediti utjecaj toplinske i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom visokog intenziteta na prinos ukupnih proteina, ukupnih fenolnih spojeva i njihovu antioksidacijsku aktivnost iz suhих, fino mljevenih peleta dobivenih sušenjem pulpe zaostale nakon prešanja soka iz svježeg lišća šećerne repe. Također, izmjerene su vrijednosti dvaju fizikalnih svojstava (pH i električna provodnost) dobivenih ekstrakata. Praćen je i kontroliran porast temperature tijekom ultrazvukom potpomognute ekstrakcije kako bi se eliminirao utjecaj temperature pošto se u provedenom istraživanju navedena metoda koristila kao alternativni netoplinski način procesiranja u kontekstu održivih i naprednih tehnika procesiranja koje za cilj imaju povećati efikasnost procesa smanjenjem utroška energije i gubitka bioaktivnosti temperaturno labilnih komponenata. Također, provedena je statistička obrada dobivenih rezultata u svrhu optimizacije parametara ekstrakcije. U slijedećim potpoglavljima prikazani su rezultati ranije opisanih i provedenih fizikalno-kemijskih analiza (tablica 3 i tablica 4), njihova statistička obrada (tablica 5 i tablica 6) i rasprava navedenog.

### **4.1. REZULTATI I RASPRAVA FIZIKALNO-KEMIJSKIH ANALIZA PROVEDENIH NAKON TOPLINSKE I ULTRAZVUKOM VISOKOG INTENZITETA POTPOMOGNUTE EKSTRAKCIJE**

#### **4.1.1. Rezultat ukupne suhe tvari u peletima**

Ukupna suha tvar određena je kao srednja vrijednost dvaju izvaganih vrijednosti mase izračunatih prema jednadžbi [5] opisanoj u poglavlju 3.2.7. te iznosi  $93,11 \pm 0,23$  %.

#### **4.1.2. Vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara ekstrakata dobivenih ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom**

**Tablica 3.** Rezultati fizikalno-kemijskih analiza provedenih na ekstraktima dobivenim tretmanom ekstrakcije ultrazvukom visokog intenziteta

Uzorak	pH	Električna vodljivost ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Ukupni proteini (mg BSA/g s.tv.)	Ukupni fenoli (mg GAE/g s.tv.)	FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.tv.}$ )	DPPH ( $\mu\text{mol TE}/\text{g s.tv.}$ )
UP1	5,81 $\pm$ 0,02	1467 $\pm$ 5,66	24,26 $\pm$ 0,21	3,14 $\pm$ 0,08	21,44 $\pm$ 0,31	1,4 $\pm$ 0,02
UP2	5,76 $\pm$ 0	1449 $\pm$ 4,24	29,40 $\pm$ 0,08	3,73 $\pm$ 0,02	20,89 $\pm$ 0,02	1,2 $\pm$ 0,02
UP3	5,59 $\pm$ 0,02	2924 $\pm$ 38,18	37,52 $\pm$ 0,59	3,86 $\pm$ 0,12	22,88 $\pm$ 0,01	1,87 $\pm$ 0,02
UP4	5,74 $\pm$ 0	1449,5 $\pm$ 0,71	24,86 $\pm$ 0	3,11 $\pm$ 0,01	19,84 $\pm$ 0,34	1,30 $\pm$ 0,03
UP5	6,71 $\pm$ 0,01	876,80 $\pm$ 6,79	21,85 $\pm$ 0	4,14 $\pm$ 0,36	19,78 $\pm$ 0,07	1,33 $\pm$ 0,04
UP6	6,40 $\pm$ 0,03	836,70 $\pm$ 7,64	24,59 $\pm$ 2,51	3,47 $\pm$ 0,03	18,20 $\pm$ 0,82	1,43 $\pm$ 0,01
UP7	5,41 $\pm$ 0,03	2898,50 $\pm$ 2,12	24,70 $\pm$ 0,21	2,84 $\pm$ 0,03	16,15 $\pm$ 0,44	2,09 $\pm$ 0,06
UP8	5,36 $\pm$ 0,01	3033,50 $\pm$ 12,02	38,42 $\pm$ 1,33	4,24 $\pm$ 0,03	20,19 $\pm$ 0,06	1,68 $\pm$ 0,01
UP9	6,59 $\pm$ 0,03	882,75 $\pm$ 7,42	32,85 $\pm$ 0,85	6,23 $\pm$ 0,56	25,07 $\pm$ 0,31	1,26 $\pm$ 0,01
UP10	6,53 $\pm$ 0,03	777,35 $\pm$ 5,02	13,09 $\pm$ 0,13	2,74 $\pm$ 0,24	14,22 $\pm$ 0,26	1,30 $\pm$ 0,04
UP11	5,74 $\pm$ 0,02	1515 $\pm$ 7,07	42,69 $\pm$ 0,79	5,1 $\pm$ 0,11	30,46 $\pm$ 0,74	0,56 $\pm$ 0,04
UP12	5,35 $\pm$ 0	2923,50 $\pm$ 160,51	50,31 $\pm$ 1,70	4,77 $\pm$ 0,06	25,41 $\pm$ 0,13	1,83 $\pm$ 0
UP13	5,81 $\pm$ 0	1607 $\pm$ 9,90	41,57 $\pm$ 1,59	6,03 $\pm$ 0,06	30,07 $\pm$ 0,88	1,02 $\pm$ 0,01
UP14	5,28 $\pm$ 0,03	3008,50 $\pm$ 57,28	46,60 $\pm$ 0,21	5,32 $\pm$ 0,01	23,39 $\pm$ 0,38	1,70 $\pm$ 0,04
UP15	5,81 $\pm$ 0	1265 $\pm$ 1,41	14,01 $\pm$ 0,32	2,07 $\pm$ 0,02	14,44 $\pm$ 0,03	1,30 $\pm$ 0,01
UP16	6,58 $\pm$ 0,02	866,25 $\pm$ 7,99	20,30 $\pm$ 0,53	3,91 $\pm$ 0,14	19,63 $\pm$ 0,54	1,34 $\pm$ 0,03
UP17	5,71 $\pm$ 0,01	1507 $\pm$ 4,24	26,37 $\pm$ 1,51	3,37 $\pm$ 0,08	22,43 $\pm$ 0,48	1,33 $\pm$ 0,01
UP18	5,29 $\pm$ 0	2913,50 $\pm$ 23,33	55,38 $\pm$ 2,57	5,79 $\pm$ 0,04	28,41 $\pm$ 0,09	2,09 $\pm$ 0,01



UP19	$6,62 \pm 0$	$869,60 \pm 1,41$	$24,54 \pm 0,46$	$3,62 \pm 0,02$	$21,70 \pm 0,29$	$1,31 \pm 0,02$
UP20	$5,35 \pm 0$	$2910 \pm 93,34$	$53,04 \pm 0,21$	$5,28 \pm 0,01$	$26,56 \pm 1,28$	$2,11 \pm 0,03$
UP21	$5,70 \pm 0,03$	$1553,50 \pm 16,26$	$32,11 \pm 1,40$	$4,56 \pm 0,02$	$24,91 \pm 0,10$	$1,19 \pm 0,02$
UP22	$5,32 \pm 0$	$3028 \pm 19,80$	$35,15 \pm 0,27$	$3,50 \pm 0,06$	$18,98 \pm 0,30$	$2,03 \pm 0,02$
UP23	$6,33 \pm 0,02$	$1558 \pm 15,56$	$39,03 \pm 0,59$	$4,59 \pm 0,07$	$28,29 \pm 0,73$	$0,69 \pm 0,02$
UP24	$6,71 \pm 0,01$	$860,55 \pm 6,43$	$33,92 \pm 0,93$	$5,68 \pm 0,18$	$26,20 \pm 0,76$	$1,04 \pm 0$
UP25	$5,32 \pm 0,05$	$3011 \pm 14,14$	$35,71 \pm 0,4$	$4,24 \pm 0,09$	$17,70 \pm 0,34$	$1,93 \pm 0,03$
UP26	$6,41 \pm 0,01$	$853,55 \pm 5,59$	$25,48 \pm 0,34$	$4,32 \pm 0,54$	$20,95 \pm 1,04$	$1,40 \pm 0,01$
UP27	$6,53 \pm 0,02$	$811 \pm 1,27$	$16,89 \pm 0,99$	$3,67 \pm 0,36$	$17,67 \pm 1,73$	$1,54 \pm 0,05$

Dobiveni rezultati (tablica 3) izraženi su kao srednje vrijednosti dvaju uzastopnih mjerenja kada su u pitanju fizikalni parametri (pH i električna vodljivost) te kao srednje vrijednosti dviju paralela kada su u pitanju kemijski parametri (ukupni proteini, ukupni fenoli, antioksidacijska aktivnost). Iz tablice 3 se može iščitati kako se pH ekstrakata dobivenih ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom visokog intenziteta kreće od blago kiselog do skoro pa neutralnog područja pri čemu je najniža vrijednost ( $5,28 \pm 0,03$ ) zabilježena kod uzorka UP14 (amplituda 75 %, vrijeme tretmana 6 min, udio etanola u otapalu 0 %), a najviša ( $6,71 \pm 0,01$ ) kod uzorka UP5 (amplituda 75 %, vrijeme tretmana 6 min, udio etanola u otapalu 50 %). Navedeno je u skladu s istraživanjem koje su proveli Kara i sur. (2022) gdje su zamijetili kako porast udjela etanola u ekstrakcijskom otapalu utječe na porast pH vrijednosti dobivenih ekstrakata. Rezultati provodnosti su pak prikazali suprotan trend. Naime, ekstrakti ekstrahirani otapalom s najvećim udjelom etanola zabilježili su najniže vrijednosti električne provodnosti, dok su oni dobiveni ekstrakcijom s deioniziranom vodom imali najviše vrijednosti. Pritom je uzorak UP10 (amplituda 50 %, vrijeme tretmana 3 min, udio etanola u otapalu 50 %) imao najnižu vrijednost u iznosu od  $777,35 \pm 5,02 \mu\text{S/cm}$ , a uzorak UP8 (amplituda 100 %, vrijeme tretmana 3 min, udio etanola u otapalu 0 %) u iznosu od  $3033,50 \pm 12,02 \mu\text{S/cm}$ . Povećanjem udjela etanola u ekstrakcijskom otapalu smanjuje se polarnost i dielektrična konstanta otapala i samim time mogućnost ekstrahiranih komponenti poput organskih kiselina da disociraju na pripadajuće ione (Lim i Cheong, 2015). Navedeno je moglo uzrokovati pad koncentracije disociranih komponenata i samim time količinu iona poput  $\text{H}^+$  čija prisutnost smanjuje pH vrijednost i povećava električnu vodljivost otopine. Najveća koncentracija ukupnih fenola zabilježena je u ekstraktu uzorka UP9 (amplituda 75 %, vrijeme tretmana 9 min, udio etanola u otapalu 50 %) i iznosila je  $6,23 \text{ mg} \pm 0,56 \text{ mg GAE/g s.tv.}$  dok je najmanja vrijednost koncentracije ukupnih fenola zabilježena u ekstraktu uzorka UP15 (amplituda 50 %, vrijeme tretmana 3 min, udio etanola u otapalu 25 %) te je iznosila  $2,07 \text{ mg GAE/g s.tv.}$  Navedeno se može usporediti s istraživanjem Arteaga-Crespa i sur. (2020) koji su zabilježili kako su jedne od najbitnijih varijabli ultrazvučne ekstrakcije fenolnih spojeva iz lišća biljne vrste *Ilex guayusa* bili udio etanola u otapalu i vrijeme tretmana pri čemu su dva, od ukupno tri, optimalna parametra određena statističkom analizom bili 76,8 % etanola u ekstrakcijskom otapalu i vrijeme tretmana u trajanju 29,9 min. U usporedbi s istraživanjem koje su proveli Dukić i sur. (2022), na svježem i osušenom lišću šećerne repe, količina ukupnih ekstrahiranih proteina iz osušenih peleta lišća šećerne repe bitno je manja. Dukić i sur. (2022) su zabilježili najveću količinu ekstrahiranih proteina u iznosu od  $147,91 \text{ mg BSA/g s.tv.}$  dok je u ovom istraživanju najveća količina iznosila  $55,38 \pm 2,57 \text{ mg BSA/g s.tv.}$  i pripadala je uzorku UP18 (amplituda 100 %, vrijeme tretmana 9 min, udio etanola u otapalu 0 %). Unatoč tome postoji direktna poveznica sa navedenom

studijom koju su proveli Dukić i sur. (2022) pri čemu su jednaki procesni parametri (amplituda 100 %, vrijeme tretmana 9 min, otapalo čista deionizirana voda) u obje studije rezultirali najvećim zabilježenim prinosom proteina u odnosu na ostale uzorke. Navedeno je rezultat tretmana ultrazvukom visoke frekvencije uz primjenu maksimalne amplitude (100 %) i najduljeg odabranog vremena tretmana (9 min) pri čemu je dokazani pozitivan efekt akustične kavitacije na proces ekstrakcije maksimalno djelovao u okviru odabranih parametara, a upotreba deionizirane vode kao otapala olakšala je topljivost proteina koji su općenito najbolje topljivi u vodi (Pace i sur., 2004). Razlike u maksimalnim prinosima, pri istim uvjetima ekstrakcije, između dvije studije uvjetovane su izborom tretirane sirovine. Pošto su peleti dobiveni sušenjem pulpe zaostale nakon prešanja soka iz svježeg lišća šećerne repe došlo je do određenog gubitka u vodi topljivih proteina u procesu prešanja, a koji, prema ranije spomenutim navodima u ovom istraživanju, čine oko 50 % ukupnih proteina sadržanih u listu šećerne repe. Najmanji prinos proteina zabilježen je u uzorku UP10 (amplituda 50 %, vrijeme tretmana 3 min, udio etanola u otapalu 50 %) te je iznosio  $13,09 \pm 0,13$  mg BSA/g s.tv. Nadalje, vrijednosti antioksidacijskih aktivnosti bitno se razlikuju između primijenjenih metoda pri čemu je FRAP metoda zabilježila veće vrijednosti (najveća vrijednost u iznosu  $30,46 \pm 0,74$   $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.tv.}$ ) u odnosu na DPPH metodu (najveća vrijednost u iznosu  $2,11 \pm 0,03$   $\mu\text{mol TE}/\text{g s.tv.}$ ). Navedeno je u skladu sa sličnim istraživanjem koje je provela Oraščanin (2023) na uzorcima suhog lišća šećerne repe gdje je primijećen isti trend pri čemu se kao objašnjenje može navesti razlika u kompatibilnosti primijenjenih metoda s fenolnim spojevima u dobivenim ekstraktima pri čemu dolazi do različitog stupnja reakcije s korištenim radikalima (Rumpf i sur., 2023; Shah i Modi, 2015).

Također, iz temperatura izmjerenih na početku i na kraju procesa može se zaključiti kako je ultrazvuk uspješno primijenjen kao netopljinska metoda s obzirom da su očitane temperature na kraju procesa iznosile do maksimalno 9 °C više u odnosu na sobnu temperaturu (25 °C) odnosno proces ekstrakcije je proveden u uvjetima umjerene temperature (Jadhav, 2021). Pritom je raspon izmjerenih vrijednosti temperatura uzoraka iznosio od minimalno 11 °C prije početka tretmana do maksimalno 34 °C nakon provedenog tretmana.

#### 4.1.3. Vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara ekstrakata dobivenih toplinskom ekstrakcijom

**Tablica 4.** Prikaz rezultata fizikalno-kemijskih analiza provedenih na ekstraktima dobivenim toplinskom ekstrakcijom

<b>Uzorak</b>	<b>pH</b>	<b>Električna vodljivost (<math>\mu\text{S}/\text{cm}</math>)</b>	<b>Ukupni proteini (mg BSA/g s.tv.)</b>	<b>Ukupni fenoli (mg GAE/g s.tv.)</b>	<b>FRAP (<math>\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.tv.}</math>)</b>	<b>DPPH (<math>\mu\text{mol TE}/\text{g s.tv.}</math>)</b>
TPE 0/3	5,61 $\pm$ 0,05	3145,50 $\pm$ 17,68	25,95 $\pm$ 0,51	2,90 $\pm$ 0,04	11,53 $\pm$ 0,45	2,06 $\pm$ 0,01
TPE 0/6	5,65 $\pm$ 0	2973 $\pm$ 94,75	25,95 $\pm$ 0,21	3,04 $\pm$ 0	11,08 $\pm$ 0,31	1,82 $\pm$ 0,02
TPE 0/9	5,66 $\pm$ 0,02	2804 $\pm$ 21,21	23,71 $\pm$ 0,19	3,16 $\pm$ 0,10	11,38 $\pm$ 0,22	2,03 $\pm$ 0,18
TPE 25/3	5,94 $\pm$ 0,01	1619,50 $\pm$ 6,36	20,14 $\pm$ 0,34	3,31 $\pm$ 0,08	16,25 $\pm$ 0,09	1,70 $\pm$ 0,02
TPE 25/6	5,99 $\pm$ 0	1604 $\pm$ 0	22,66 $\pm$ 0,19	3,27 $\pm$ 0,07	19,3 $\pm$ 0,28	1,79 $\pm$ 0,01
TPE 25/9	5,96 $\pm$ 0,01	1655 $\pm$ 0	23,94 $\pm$ 0,66	3,32 $\pm$ 0	23,32 $\pm$ 0,23	1,74 $\pm$ 0,01
TPE 50/3	6,33 $\pm$ 0	1004 $\pm$ 1,41	21,64 $\pm$ 0,72	3,83 $\pm$ 0,12	25 $\pm$ 0,39	1,45 $\pm$ 0
TPE 50/6	6,52 $\pm$ 0,01	1027 $\pm$ 2,83	26,97 $\pm$ 0,21	4,62 $\pm$ 0,23	26,48 $\pm$ 0,77	1,29 $\pm$ 0,01
TPE 50/9	6,59 $\pm$ 0	1033,5 $\pm$ 4,95	26,05 $\pm$ 0,11	3,93 $\pm$ 0,04	23,42 $\pm$ 1,09	1,22 $\pm$ 0,01

Dobiveni rezultati (tablica 4) izraženi su kao srednje vrijednosti dvaju uzastopnih mjerenja kada su u pitanju fizikalni parametri (pH i električna vodljivost) te kao srednje vrijednosti dviju paralela kada su u pitanju kemijski parametri (ukupni proteini, ukupni fenoli, antioksidacijska aktivnost). Iz tablice 4 može se vidjeti kako se pH vrijednosti ekstrakata kreću u području između blago kiselog do skoro pa neutralnog pH. Najveća pH zabilježena je kod uzorka TPE 50/9, a iznosila je 6,59. Najniža pH vrijednost zabilježena je kod uzorka TPE 0/3 i iznosila je  $5,61 \pm 0,05$ . Može se primijetiti pad električne provodnosti ekstrakata s obzirom na rastući udio etanola u ekstrakcijskom otapalu. Pa tako uzorak TPE 50/3 bilježi najnižu vrijednost u iznosu od  $1004 \pm 1,41 \mu\text{S/cm}$ , a uzorak TPE 0/3 najvišu u iznosu od  $3145,5 \pm 17,68 \mu\text{S/cm}$ . Prinos ukupnih proteina između analiziranih ekstrakata se nije bitno mijenjao no najveće vrijednosti su primijećene pri korištenju čiste deionizirane vode i 50 %-tnog etanola u funkciji ekstrakcijskih otapala. Moguće objašnjenje je u različitoj prirodi ekstrahiranih proteina. Naime, proteini sadržani u listu šećerne repe dijele se na one topljive u vodi i netopljive. Postupak dobivanja sušenih peleta doveo je do određenog gubitka u vodi topljivih proteina. Sadržaj peleta većinom predstavljaju kruti sastojci zaostali nakon prešanja soka iz svježeg lišća. Stoga je za očekivati kako su, osim određene količine u vodi topljivih proteina, zaostale membranske strukture poput tilakoidnih membrana u kojima se nalazi većina hidrofobne proteinske frakcije biljnih listova i koja se u prisustvu porasta udjela slabo polarnog otapala poput etanola ekstrahirala (Tenorio, 2017; Zhang i sur., 2017). Također, porast prinosa proteina u uzorcima s 50 %-tnim etanolom kao otapalom može biti uvjetovan prisutnošću kompleksa između proteina i fenolnih spojeva pri čemu se dodatna količina proteina ekstrahirala zajedno s hidrofobnijim fenolnim spojevima poput tanina i flavonoida koji se bolje otapaju u manje polarnim otapalima poput etanola (dos Santos-Silva i sur., 2024; Bandyopadhyay i sur., 2012). Prinosu ekstrakcije ukupnih fenola pogodovali su porast udjela etanola u ekstrakcijskom otapalu i vrijeme toplinskog tretmana no najveći prinos je zabilježen u slučaju ekstrakta TPE 50/6 te je iznosio  $4,62 \pm 0,23 \text{ mg GAE/g s.tv.}$  U istom uzorku je također zabilježena i najveća antioksidacijska aktivnost ( $26,48 \pm 0,77 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.tv.}$ ) toplinskih ekstrakata određena FRAP metodom te su antioksidacijske vrijednosti svih ekstrakata općenito veće u slučaju mjerenja FRAP metodom u odnosu na DPPH metodu. Navedeni rezultati prinosa ukupnih fenola, vrijednosti antioksidacijskih aktivnosti određenih FRAP metodom i njihova razlika u odnosu na DPPH metodu mogu biti objašnjeni prirodom ekstrahiranih fenolnih spojeva. Točnije rečeno, zaostala frakcija fenolnih spojeva u peletima, nakon prešanja soka iz svježeg lišća šećerne repe, vjerojatno sadrži veći udio fenolnih vrsta poput flavonoida koje su bolje topljive u manje polarnim otapalima poput etanola, a koje se, zbog svoje biološke uloge u obrani od patogena i biljoždera i zaštiti od UV zračenja, općenito nalaze u dijelovima biljke na granici s vanjskim okolišem kao što su npr. listovi (Herrera-Pool i sur., 2021; Kumar i sur., 2020).

#### 4.1.4. Usporedba i rasprava rezultata fizikalno-kemijskih parametara toplinskih ekstrakata i ekstrakata ultrazvukom potpomognute ekstrakcije

Usporedbom dobivenih rezultata može se uočiti sličan trend u raspodijeli vrijednosti fizikalnih parametara u ovisnosti o korištenom otapalu. Pritom su najniže pH vrijednosti ( $5,61 \pm 0,05$  za toplinski tretman i  $5,28 \pm 0,03$  za ultrazvučni tretman) zabilježene kod ekstrakata dobivenih primjenom deionizirane vode kao ekstrakcijskog otapala te se jednako tako može uočiti porast električne provodnosti u navedenim ekstraktima. Također, raspon pH vrijednosti te iznos gornje i donje granice relativno su podjednaki u obje metode ekstrakcije. Isto se ne može reći za parametar električne provodnosti gdje se mogu zamijetiti znatno niže vrijednosti u slučaju uzoraka tretiranih ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom, lako su vrijednosti gornje granice ( $3033,5 \pm 12,02 \mu\text{S/cm}$  za ultrazvučni tretman i  $3145,50 \pm 17,68 \mu\text{S/cm}$  za toplinski tretman) relativno jednake. Kao objašnjenje može poslužiti općeniti utjecaj temperature na porast električne provodnosti zbog poboljšane topljivosti malih iona poput natrija, magnezija i kalija, a koji su zbog svoje biološke uloge uvelike zastupljeni u svim živim stanicama pa tako, u slučaju provedenog istraživanja, i u onima biljnog porijekla. Također, povišena temperatura smanjuje viskoznost otopina čime efektivno pospješuje mobilnost sadržanih ionskih vrsta što rezultira većom električnom provodnosti (Yuan i sur., 2018). S druge strane, ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija rezultirala je najvećim prinosom ukupnih proteina i fenola što je u skladu sa studijom koju su proveli Dukić i sur. (2022). Pritom je najveći prinos ukupnih proteina postignut pri istim ekstrakcijskim parametrima kao i u slučaju Dukić i sur. (2022). S druge strane najveći prinos ukupnih fenola u ovoj studiji postignut je u bitno drugačijim uvjetima (amplituda 75 %, 50 %-tni etanol kao otapalo) s time da su i najveći prinosi ukupnih fenola ( $3,83 \pm 0,12$ ;  $4,62 \pm 0,23$  te  $3,93 \pm 0,04 \text{ mg GAE/g s.tv.}$ ) u slučaju toplinskih ekstrakcija zabilježeni pri korištenju 50 %-tnog etanola kao otapala. Pritom se kao razlog može navesti priroda preostalih fenolnih spojeva u peletima čiju većinu vjerojatno čine oni bolje topljivi u manje polarnim otapalima poput etanola. Sličan trend su u svojoj studiji primijetili Sharmila i sur. (2016) pri čemu je upotreba 80 %-tnog etanola i 80 %-tnog metanola, tijekom ultrazvukom potpomognute ekstrakcije ukupnih fenola iz lista biljne vrste *Cassia auriculata*, rezultirala duplo većim prinosom ukupnih fenola u odnosu na ekstrakte kod kojih je kao otapalo korištena voda. Primjena ultrazvukom potpomognute ekstrakcije rezultirala je i najvećim vrijednostima antioksidacijske aktivnosti neovisno o primijenjenoj metodi mjerenja ( $30,46 \pm 0,74 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.tv.}$  za FRAP i  $2,11 \pm 0,03 \mu\text{mol TE/g s.tv.}$  za DPPH). Sličnost između dvije primijenjene metode ekstrakcije (toplinske i ultrazvučne) vidljiva je u odnosu izmjerenih vrijednosti antioksidacijske aktivnosti pri čemu je u oba slučaja primjena FRAP metode rezultirala višestruko većom vrijednošću u odnosu na DPPH metodu. Prisustvo navedene razlike u slučaju dvije različite metode ekstrakcije vjerojatno je posljedica prirode ekstrahiranih antioksidativnih spojeva koji pokazuju bitno drugačiju biološku aktivnost

prema korištenim radikalima pri čemu je slična razlika zamijećena u studiji antioksidativne aktivnosti različitih vrsta lignina koju su proveli Rumpf i sur. (2023) gdje je FRAP metoda rezultirala većom izmjerenom vrijednosti antioksidativne aktivnosti u odnosu na mjerenje DPPH metodom. Činjenica da su najveće vrijednosti prinosa ukupnih proteina ( $55,38 \pm 2,57$  mg BSA/g s.tv.) i fenola ( $6,23 \pm 0,56$  mg GAE/g s.tv.) te antioksidacijske aktivnosti ( $30,46 \pm 0,74$   $\mu$ mol Fe<sup>2+</sup>/g s.tv. za FRAP i  $2,11 \pm 0,03$   $\mu$ mol TE/g s.tv. za DPPH) zabilježene u slučaju ekstrakata dobivenih ultrazvukom potpomognutom ekstrakcijom može se objasniti dokazanim prednostima koje pruža primjena ultrazvuka. Pojavom fenomena akustične kavitacije u otopini, pri upotrebi ultrazvuka visokog intenziteta, dolazi do bubrenja i pucanja staničnih struktura što rezultira izlaskom unutarstaničnog sadržaja, implozija nastalih mjehurića dovodi do razvoja ekstremno visokih temperatura i tlakova na mikro lokacijama unutar otopine što pospješuje prijenos mase, formirani mikro mlazovi omogućavaju potpunije prodiranje otapala i sukladno tome povećan kontakt s ekstrahiranim komponentama, a umjerena temperatura procesa omogućava očuvanje biološke aktivnosti termolabilnih fenolnih spojeva i proteina (Dukić i sur., 2022; Chemat i sur., 2017).

## 4.2. REZULTATI STATISTIČKE OBRADE PODATAKA

### 4.2.1. Rezultati statističke obrade podataka ultrazvučno tretiranih uzoraka

**Tablica 5.** Utjecaj ulaznih varijabli (A-amplituda, B-vrijeme tretiranja, C-udio etanola u otapalu, AA-kvadratna interakcija amplitude, AB-interakcija amplitude i vremena tretiranja, AC-interakcija amplitude i udjela etanola u otapalu, BB-kvadratna interakcija vremena tretiranja, BC-interakcija vremena tretiranja i udjela etanola u otapalu, CC-kvadratna interakcija udjela etanola u otapalu) na izlazne varijable (fizikalno-kemijski parametri) ekstrakata dobivenim ekstrakcijom ultrazvukom visokog intenziteta

Ulazne varijable	p – vrijednost*					
	pH	G**	Ukupni proteini	Ukupni fenoli	FRAP	DPPH
A	0,3670	0,0950	0	0	0	0,0762
B	0,1050	0,1066	0	0	0	0,0779
C	0	0	0	0,3761	0,0169	0
AA	0,4053	0,1649	0,0401	0,0609	0,1157	0,9050
AB	0,9432	0,0534	0,7474	0,3115	0,4831	0,5383
AC	0,8055	0,9975	0,0393	0,7257	0,1536	0,7680
BB	0,4298	0,0488	0,1359	0,0583	0,2056	0,9208
BC	0,5314	0,0479	0,2418	0,4918	0,9451	0,2019
CC	0,0280	0	0,0433	0,1315	0,0009	0

\*crveno označene vrijednosti označavaju statistički značajan utjecaj ( $p < 0,05$ )

\*\*G – električna vodljivost

U tablici 5 prikazane su  $p$  – vrijednosti ulaznih varijabli (parametri ekstrakcije) za svaku od izlaznih varijabli (fizikalno-kemijski parametri) u slučaju ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Multivarijatna analiza varijance (MANOVA) dijeli varijabilnost u izlaznim parametrima u zasebne dijelove za svaki od učinaka odnosno za svaku od ulaznih varijabli. Zatim testira statističku značajnost svakog ulaznog parametra uspoređujući vrijednost srednjih kvadrata s procjenom eksperimentalne pogreške. Pritom je učinak ulazne varijable statistički značajan ako izračunata  $p$  – vrijednost iznosi  $< 0,05$  što znači da se značajno razlikuje od nule na razini pouzdanosti od 95 %. Iz prikazanih podataka može se vidjeti kako statistički značajan utjecaj na pH vrijednost pokazuju udio etanola u otapalu i kvadratna interakcija udjela etanola. Navedeno je u skladu s prethodno komentiranim rezultatima pH vrijednosti pri čemu je zamijećeno kako pH vrijednost raste povećanjem udjela etanola u otapalu odnosno pada smanjenjem udjela, a dostiže maksimalne vrijednosti u uzorcima za čiju se ekstrakciju koristila deionizirana voda. Statistički izračunata optimalna vrijednost pH iznosi 6,69, a kao optimalni parametri navode se amplituda od 70,5 %, vrijeme tretmana u trajanju od 9 min i 50 %-tni udio etanola u otapalu. U slučaju električne provodnosti statistički značajan utjecaj su pokazale: linearna interakcija udjela etanola, kvadratna interakcija vremena trajanja tretmana, interakcija udjela etanola i vremena trajanja tretmana te kvadratna interakcija udjela etanola. To znači da promjenu udjela etanola prati i promjena u električnoj vodljivosti, ali i da pri ekstremnim vrijednostima udjela etanola (0 % i 50 %) dolazi do velikih promjena u vrijednosti električne provodnosti. Navedene  $p$  – vrijednosti ukazuju kako na promjenu u vrijednosti električne provodnosti utječe i kombinirani efekt vremena tretiranja i udjela etanola u otapalu te da vrijeme tretiranja, zbog isključivo statistički značajne kvadratne interakcije, dovodi do uvelike izraženih promjena u vrijednostima električne provodnosti primjenom najkraćeg ili najduljeg vremena tretiranja. Kao cilj je postavljena optimizacija električne provodnosti pri čemu statistički određena optimalna vrijednost iznosi 3021,25  $\mu\text{S}/\text{cm}$  primjenom slijedećih optimalnih parametara: amplituda 87,5 %, vrijeme tretmana 5,12 min i udio etanola u ekstrakcijskom otapalu 0,000006 %. U slučaju prinosa proteina zamjećuje se više statistički značajnih ulaznih varijabli i njihovih kombinacija. Kao statistički značajni učinci određena su sva tri ulazna parametra pojedinačno (amplituda, vrijeme tretiranja, udio etanola), kvadratna interakcija amplitude, međusobna interakcija amplitude i udjela etanola te kvadratna interakcija udjela etanola. Navedeno znači kako promjena u ukupnim proteinima linearno prati promjenu u pojedinačnim ulaznim varijablama što je vidljivo iz najvećeg zabilježenog prinosa proteina ( $55,38 \pm 2,57$  mg BSA/g s.tv.) pri parametrima ekstrakcije s najvišom primijenjenom amplitudom (100 %), najduljim vremenom tretmana (9 min) i najmanjim udjelom etanola u otapalu (0 %) dok je najmanji prinos proteina



(13,09 ± 0,13 mg BSA/g s.tv.) zabilježen pri parametrima ekstrakcije s najnižom primijenjenom amplitudom (50 %), najkraćim vremenom tretmana (3 min) i najvećim udjelom etanola u otapalu (50 %). Također, navedeni statistički značajni utjecaji kvadratne interakcije amplitude i kvadratne interakcije etanola pojašnjavaju kako do velikih promjena u prinosu ukupnih proteina dolazi primjenom ekstremnih (najviših ili najnižih) vrijednosti amplitude i udjela etanola. Povezivanjem dobivenih rezultata prinosa i statistički značajne međusobne interakcije amplitude i udjela etanola može se vidjeti kako je navedena interakcija antagonistična odnosno povećanje udjela etanola pri istim uvjetima amplitude rezultira smanjenjem prinosa ukupnih proteina. Optimizacijom uvjeta za maksimalni prinos ukupnih proteina statistički su određeni slijedeći parametri: amplituda 100 %, vrijeme tretmana u trajanju od 9 min i 0 % etanola u ekstrakcijskom otapalu. Za prinos ukupnih fenola statistički značajnim su se pokazali pojedinačni utjecaji amplitude i vremena trajanja tretmana što znači da se prinos fenolnih spojeva mijenjao promjenom vrijednosti navedenih parametara neovisno o drugim ulaznim parametrima. Optimizacijom uvjeta tretiranja statističkom su obradom za optimalni prinos ukupnih fenola određeni slijedeći parametri: amplituda 100 %, vrijeme tretmana u trajanju od 8,84 min i udio etanola u otapalu u iznosu od 0,000001 %. Tako dobiven optimalni prinos ukupnih fenola iznosio bi 5,77 mg GAE/g s.tv. što je manje od prinosa ostvarenog u provedenom (6,23 mg GAE/g s.tv.) istraživanju pri čemu je udio etanola u ekstrakcijskom otapalu bio 50 % uz amplitudu 75 % i vrijeme tretiranja 9 min. Navedeno se može pripisati ranije opisanoj mogućoj prisutnosti fenolnih spojeva koji su bolje topljivi u manje polarnim otapalima dok su primijenjena amplituda i dugo vrijeme tretiranja dodatno pridonijeli potpunijoj ekstrakciji s obzirom na svoj statistički značajan utjecaj (tablica 5). Kod antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom statistički značajnim su se pokazali pojedinačni utjecaji amplitude, vremena trajanja ekstrakcije i udjela etanola te kvadratna interakcija udjela etanola. Optimizacija antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom je statističkim izračunom definirana pri slijedećim parametrima: amplituda 99,99 %, vrijeme trajanja tretmana 9 min i udio etanola u otapalu u iznosu 17,06 %. Pritom bi se dobivena optimalna vrijednost u odnosu na maksimalnu zabilježenu vrijednost antioksidacijske aktivnosti u ovom istraživanju razlikovala za – 0,11  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.tv.}$  što ne predstavlja značajnu razliku kada se uzme u obzir da bi potrošnja otapala bila smanjena oko 8 %. Za antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom od statističkog su se značaja pokazali samo pojedinačni ulazni parametar etanola i njegova kvadratna interakcija. Općenito, u dobivenim je rezultatima najveća antioksidacijska aktivnost (2,11; 2,09; 2,09; 2,03; 1,93; 1,87; 1,83  $\mu\text{mol TE}/\text{g s.tv.}$ ) zamijećena u ekstraktima s deionizirano vodom, dok su najniže aktivnosti (0,56; 0,69; 1,02; 1,04  $\mu\text{mol TE}/\text{g s.tv.}$ ) zamijećene kod viših udjela etanola. Navedeno odgovara statistički značajnom utjecaju kvadratne interakcije udjela etanola pri čemu najmanji i najveći udio dovode do ekstremnih

promjena u vrijednosti antioksidacijske aktivnosti. Tu je bitno napomenuti da, iako je ekstrakt s najvećom zabilježenom antioksidacijskom aktivnosti ( $2,11 \pm 0,03 \mu\text{mol TE/g s.tv.}$ ) ekstrahiran s deioniziranom vodom, ekstrakt s najmanjom antioksidacijskom aktivnosti ( $0,56 \pm 0,04 \mu\text{mol TE/g s.tv.}$ ) ekstrahiran je s 25 % otopinom etanola što nije u potpunosti u skladu s opisom kvadratne interakcije. Navedena se pojava može opisati već objašnjenim mogućim prisustvom fenolnih spojeva koji su bolje topljivi u manje polarnim otapalima pri čemu su ekstrakti s 50 %-tnim etanolom zauzeli umjerene vrijednosti u raspodjeli izmjerenih antioksidacijskih aktivnosti. Uvjeti za dobivanje optimalne vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ( $2,05 \mu\text{mol TE/g s.tv.}$ ) određeni statističkim izračunom su slijedeći: amplituda 50 %, vrijeme tretmana 9 min, udio etanola 0 %. Pritom se navedena vrijednost neznatno razlikuje od najveće zabilježene vrijednosti u istraživanju ( $2,11 \pm 0,03 \mu\text{mol TE/g s.tv.}$ ) koja je dobivena pri korištenju istog otapala i vremena tretmana, ali pri amplitudi 75 % što znači da bi smanjenje amplitude pri istim uvjetima rezultiralo uštedom energije uz zanemarive gubitke.

#### 4.2.2 Rezultati statističke obrade podataka toplinski tretiranih uzoraka

**Tablica 6.** Utjecaj ulaznih varijabli (A-vrijeme tretiranja, B-udio etanola u otapalu, AA-kvadratna interakcija vremena tretiranja, AB-interakcija vremena tretiranja i udjela etanola u otapalu, BB-kvadratna interakcija udjela etanola u otapalu) na izlazne varijable (fizikalno-kemijski parametri) ekstrakata dobivenih toplinskom ekstrakcijom

Ulazne varijable	p – vrijednost*					
	pH	G**	Ukupni proteini	Ukupni fenoli	FRAP	DPPH
A	0,0669	0,1830	0,1496	0,6467	0,4989	0,4889
B	0,0002	0	0,7792	0,0205	0,0098	0,0061
AA	0,2897	0,8595	0,1675	0,3455	0,8301	0,4695
AB	0,1231	0,0660	0,0784	0,8055	0,8176	0,4456
BB	0,0655	0,004	0,0521	0,2754	0,5161	0,3103

\*crveno označene vrijednosti označavaju statistički značajan utjecaj ( $p < 0,05$ )

\*\*G – električna vodljivost

U tablici 6. prikazane su  $p$  – vrijednosti ulaznih varijabli (parametri ekstrakcije) za svaku od izlaznih varijabli (fizikalno-kemijski parametri) u slučaju toplinske ekstrakcije. Prema statističkim podacima dobivenim provođenjem MANOVA metode može se vidjeti kako na sve izlazne varijable, osim na prinos ukupnih proteina, statistički značajan utjecaj jedino ima linearna interakcija ulazne varijable udjela etanola. Također, samo je kod izlazne varijable električne provodnosti zamijećen i statistički značajan utjecaj kvadratne interakcije udjela etanola koji je vidljiv i u dobivenim rezultatima fizikalno-kemijskih parametara ekstrakata. Naime, električna

provodnost poprimila je bitno drugačije vrijednosti kod uzoraka čije je ekstrakcijsko otapalo činila deionizirana voda ( $3145,50 \pm 17,68 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) u odnosu na uzorke kod kojih se kao ekstrakcijsko otapalo koristila 50 % otopina etanola ( $1004 \pm 1,41 \mu\text{S}/\text{cm}$ ). Navedeno je u skladu s prirodom značajnosti utjecaja kvadratne interakcije pri čemu se najviše i najniže vrijednosti izlaznih varijabli zamjećuju prilikom primjene ekstremnih (najviših i najnižih) definiranih vrijednosti ulaznih varijabli. Dobivene  $p$  – vrijednosti za ulazni parametar vremena tretiranja djelomično se razlikuju od onih koje su zabilježene u studiji koju su proveli Dukić i sur. (2022) na suhom lišću šećerne repe. U navedenoj studiji vrijeme tretiranja također nije imalo statistički značajan utjecaj na pH vrijednost i električnu provodnost ekstrakata, ali je pokazalo statistički značajan utjecaj za prinos ukupnih proteina i fenola. Nadalje, zamijećeno je kako nijedna ulazna varijabla u slučaju toplinske ekstrakcije nema statistički značajan utjecaj na ukupan prinos proteina. Razlog navedenom može biti taj da su proteini, zaostali u pulpi nakon prešanja soka iz svježeg lišća šećerne repe, „zarobljeni“ u lignoceluloznom matriksu pulpe, a utjecaj produljenog vremena tretmana toplinske ekstrakcije bez odgovarajuće metode oslobađanja proteina (npr. akustična kavitacija u slučaju primjene ultrazvuka) samo pridonosi njihovoj daljnjoj denaturaciji čime se smanjuje efektivnost ekstrakcije (Santamaría-Fernández i Lübeck, 2020). Također, proteini su općenito najbolje topljivi u vodi te prisutnost etanola u otapalu ne dovodi do poboljšanja ekstrakcije (Pace i sur. 2004).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Primjena različitih otapala utjecala je na fizikalne parametre ekstrahiranih uzoraka pri čemu je primjena deionizirane vode rezultirala najvećim vrijednostima električne provodnosti ekstrakata ( $3145,50 \pm 17,68 \mu\text{S/cm}$  za toplinsku ekstrakciju i  $3033,50 \pm 12,02 \mu\text{S/cm}$  za ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju, a primjena etanolnih otapala rezultirala najvećim pH vrijednostima ekstrakata ( $6,59 \pm 0$  za toplinsku ekstrakciju i  $6,71 \pm 0,01$  za ultrazvukom potpomognutu ekstrakciju)
2. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija rezultirala je najvećim prinosom ukupnih proteina ( $55,38 \pm 2,57 \text{ mg BSA/g s.tv.}$ ) i najvećim prinosom ukupnih fenola ( $6,23 \pm 0,56 \text{ mg GAE/g s.tv.}$ )
3. Najviše antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom ( $30,46 \pm 0,74 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.tv.}$ ) i DPPH metodom ( $2,11 \pm 0,03 \mu\text{mol TE/g s.tv.}$ ) zabilježene su u ekstraktima dobivenim tretmanom ultrazvučno potpomognute ekstrakcije
4. Udio etanola statistički značajno utječe na izlazne vrijednosti fizikalnih parametara ekstrakata kod obje ekstrakcijske metode ( $p < 0,05$ )
5. Primijenjena amplituda te vrijeme tretiranja statistički značajno utječu na ukupni prinos proteina i fenola te antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom u ultrazvučno tretiranim uzorcima ( $p < 0,05$ )
6. Udio etanola statistički značajno utječe na ukupni prinos proteina i antioksidacijsku aktivnost (FRAP i DPPH) toplinski tretiranih uzoraka te na ukupan prinos proteina i antioksidacijsku aktivnost (FRAP i DPPH) ultrazvučno tretiranih uzoraka ( $p < 0,05$ )
7. Ultrazvuk se pokazao kao efikasna netoplinska metoda za ekstrakciju proteina i fenola iz osušenih peleta lišća šećerne repe

## 6. LITERATURA

- Adam D (2021) How far will global population rise? Researchers can't agree. *Nature*, **597(7877)**, 462–465. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-02522-6>
- Ajomiwe N, Boland M, Phongthai S, Bagiyal M, Singh J, Kaur L (2024) Protein Nutrition: Understanding Structure, Digestibility, and Bioavailability for Optimal Health. *Foods*, **13(11)**, 1771. <https://doi.org/10.3390/foods13111771>
- Akbari B, Baghaei-Yazdi N, Bahmaie M, Mahdavi Abhari F (2022) The role of plant-derived natural antioxidants in reduction of oxidative stress. *BioFactors*, **48(3)**, 611-633. <https://doi.org/10.1002/biof.1831>
- Alenyorege EA, Ma H, Ayim I, Aheto JH, Hong C, Zhou C. (2019) Reduction of *Listeria innocua* in fresh-cut Chinese cabbage by a combined washing treatment of sweeping frequency ultrasound and sodium hypochlorite. *Lwt*, **101**, 410-418. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.048>
- Ames BN (2018) Prolonging healthy aging: longevity vitamins and proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115(43)**, 10836-10844. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809045115>
- Aramrueang N, Zicari SM, Zhang R (2017) Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of sugar beet leaves into fermentable sugars for bioethanol production. *Adv Biosci Biotechn*, **8(2)**, 51. <https://doi.org/10.4236/abb.2017.82004>
- Arnold G, Leiteritz L, Zahn S, Rohm H (2009) Ultrasonic cutting of cheese: Composition affects cutting work reduction and energy demand. *Int Dairy J*, **19(5)**, 314-320. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.11.007>
- Arshad RN, Abdul-Malek Z, Roobab U, Munir MA, Naderipour A, Qureshi MI i sur. (2021) Pulsed electric field: A potential alternative towards a sustainable food processing. *Trends Food Sci Tech*, **111**, 43-54. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.041>
- Arteaga-Crespo Y, Radice M, Bravo-Sanchez LR, García-Quintana Y, Scalvenzi L (2020) Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Ilex guayusa* Loes. leaves using response surface methodology. *Heliyon*, **6(1)**. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03043>
- Ayyat MS, Ayyat AMN, Abdel-Rahman MS, Al-Sagheer AA (2024) Appraisal of leaf protein concentrate derived from sugar beet and carrot as a novel fish meal substitute for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Anim Feed Sci Tech*, **307**, 115833. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115833>
- Aziz MA, Diab AS, Mohammed AA (2019) Antioxidants. U: Emad Shalaby Antioxidant categories and mode of action, 5. izd., IntechOpen, London, str. 3-22. DOI: 10.5772/intechopen.83544
- Balfany C, Gutierrez J, Moncada M, Komarnytsky S (2023) Current status and nutritional value of green leaf protein. *Nutrients*, **15(6)**, 1327. <https://doi.org/10.3390/nu15061327>
- Bandyopadhyay P, Ghosh AK, Ghosh C (2012) Recent developments on polyphenol–protein interactions: Effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system. *Food funct*, **3(6)**, 592-605. <https://doi.org/10.1039/C2FO00006G>

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

Barbosa-Cánovas GV, Rodríguez JJ (2002) Update on nonthermal food processing technologies: pulsed electric field, high hydrostatic pressure, irradiation and ultrasound. *Food Aust* **54(11)**, 513-520

Bilgin M, Sahin S, Dramur MU, Sevgili LM (2013) Obtaining scarlet sage (*Salvia coccinea*) extract through homogenizer-and ultrasound-assisted extraction methods. *Chem Eng Comm*, **200(9)**, 1197-1209. <https://doi.org/10.1080/00986445.2012.742434>

Boincean B, Dent D (2019) Crop rotation. *Farming the Black Earth: Sustainable and Climate-Smart Management of Chernozem Soils*, str. 89-124.

Bondu S, Bonnet C, Gaubert J, Deslandes É, Turgeon SL, Beaulieu, L (2015) Bioassay-guided fractionation approach for determination of protein precursors of proteolytic bioactive metabolites from macroalgae. *J Appl Phycol*, **27**, 2059-2074. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0425-0>

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Techn*, **28**, 1, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Buchanan-Wollaston V Postharvest Physiology | Senescence,Leaves. In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 1st ed.; Thomas, B.,Ed.; Academic Press, 2003; str. 808–816.

Cai L, Zhang W, Cao A, Cao M, Li J (2019) Effects of ultrasonics combined with far infrared or microwave thawing on protein denaturation and moisture migration of *Sciaenops ocellatus* (red drum). *Ultrason Sonochem*, **55**, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.03.017>

Chaudhary P, Janmeda P, Docea AO, Yeskaliyeva B, Abdull Razis AF, Modu B (2023) Oxidative stress, free radicals and antioxidants: Potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Front Chem*, **11**, 1158198. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1158198>

Chemat F, Khan MK (2011) Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason Sonochem*, **18(4)**, 813-835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>

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

Chemat F, Vian MA, Fabiano-Tixier AS, Nutrizio M, Jambrak AR, Munekata PE (2020) A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. *Green Chem*, **22(8)**, 2325-2353. <https://doi.org/10.1039/C9GC03878G>

Coca M, Barrocal VM, Lucas S, González-Benito G, García-Cubero MT (2015) Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. *Food and Bioprod Process*, **94**, 306-312. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.03.012>

Dolganyuk V, Sukhikh S, Kalashnikova O, Ivanova S, Kashirskikh E, Prosekov A (2023) Food proteins: potential resources. *Sustain*, **15(7)**, 5863. <https://doi.org/10.3390/su15075863>

dos Santos-Silva AC, Saraiva BR, Lazzari A, Dos Santos H, de Oliveira ÉL, Sato F (2024) Optimization and Characterization of Protein Extraction from Asparagus Leafy By-Products. *Foods*, **13(6)**, 894. <https://doi.org/10.3390/foods13060894>

- Draycott AP (2008) Sugar beet, 1. izd., Wiley-Blackwell, New Jersey, str. 1-30.
- El-Gengaihi SE, Hamed MA, Aboubaker DH, Mossa AT (2016) Flavonoids from sugar beet leaves as hepatoprotective agent. *Int J Pharm Pharm Sci*, **8(4)**, 281-286.
- Espinosa R, Tago D, Treich N (2020) Infectious diseases and meat production. *Environ Resource Econ*, **76(4)**, 1019-1044. <https://doi.org/10.1007/s10640-020-00484-3>
- Fan L, Hou F, Muhammad AI, Ruiling LV, Watharkar RB, Guo M (2019) Synergistic inactivation and mechanism of thermal and ultrasound treatments against *Bacillus subtilis* spores. *Food Res Int*, **116**, 1094-1102. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.052>
- Fărcaș A, Drețcanu G, Pop TD, Enaru B, Socaci S, Diaconeasa Z (2021) Cereal processing by-products as rich sources of phenolic compounds and their potential bioactivities. *Nutrients*, **13(11)**, 3934. <https://doi.org/10.3390/nu13113934>
- Flieger J, Flieger W, Baj J, Maciejewski R (2021) Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. *Materials*, **14(15)**, 4135. <https://doi.org/10.3390/ma14154135>
- Gambuteanu C, Alexe P (2015) Comparison of thawing assisted by low-intensity ultrasound on technological properties of pork *Longissimus dorsi* muscle. *J Food Sci Tech* **52(4)**, 2130–2138 <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1204-7>
- Gaweł E (2012). Chemical composition of lucerne leaf extract (EFL) and its applications as a phytobiotic in human nutrition. *Acta Sci Pol Technol Aliment*, **11(3)**, 303-309. [www.food.actapol.net/](http://www.food.actapol.net/)
- Geada P, Moreira C, Silva M, Nunes R, Madureira L, Rocha CM (2021) Algal proteins: Production strategies and nutritional and functional properties. *Biores Technol*, **332**, 125125. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125125>
- Geissler C, Powers, HJ (2023) *Human nutrition*, Oxford University Press, Oxford, str. 29-32.
- Gil-Martín E, Forbes-Hernández T, Romero A, Cianciosi D, Giampieri F, Battino M (2022) Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. *Food Chem*, **378**, 131918. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131918>
- Gonzalez MNG, Björnsson L (2022) Life cycle assessment of the production of beet sugar and its by-products. *J Clean Prod*, **346**, 131211. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131211>
- Guo L, Sun Y, Zhu Y, Wang B, Xu L, Huang M i sur. (2020) The antibacterial mechanism of ultrasound in combination with sodium hypochlorite in the control of *Escherichia coli*. *Food Res Int*, **129**, 108887. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108887>
- Hajian M, Kashani, SJ (2021) Evolution of the concept of sustainability. From Brundtland Report to sustainable development goals. In *Sustainable resource management* (str. 1-24). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824342-8.00018-3>
- Hanelt P, Buttner R, Mansfeld R (2001) Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops (except ornamentals), Springer, Berlin
- Hassanli AM, Ahmadirad S, Beecham S (2010) Evaluation of the influence of irrigation methods and water quality on sugar beet yield and water use efficiency. *Agr Water Manage*, **97(2)**, 357-362. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2009.10.010>
- Henchion MM, De Backer CJ, Hudders L, O'Reilly S (2022) Ethical and sustainable aspects of meat production; consumer perceptions and system credibility. In *New aspects of meat*

quality (str.. 829-851). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85879-3.00001-5>

Henchion M, Hayes M, Mullen AM, Fenelon M, Tiwari B (2017) Future protein supply and demand: strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. *Foods*, **6(7)**, 53. <https://doi.org/10.3390/foods6070053>

Herrero M, Thornton PK, Mason-D'Croz D, Palmer J, Bodirsky BL, Pradhan P i sur. (2021) Articulating the effect of food systems innovation on the Sustainable Development Goals. *Lancet Planet Health*, **5(1)**, 50-62. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(20\)30277-1](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(20)30277-1)

Hirata H, Sonoda S, Agui S, Yoshida M, Ohinata K, & Yoshikawa M (2007) Rubiscolin-6, a  $\delta$  opioid peptide derived from spinach Rubisco, has anxiolytic effect via activating  $\sigma$ 1 and dopamine D1 receptors. *Peptides*, **28(10)**, 1998-2003. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.07.024>

[https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/sugar\\_en pristupljeno 19.9.2024.](https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/sugar_en pristupljeno 19.9.2024.)

Ince NH, Tezcanli G, Belen RK, Apikyan İG (2001). Ultrasound as a catalyzer of aqueous reaction systems: the state of the art and environmental applications. *App Catal B: Environ*, **29(3)**, 167-176. [https://doi.org/10.1016/S0926-3373\(00\)00224-1](https://doi.org/10.1016/S0926-3373(00)00224-1)

Jadhav HB, Annapure US, Deshmukh, RR (2021) Non-thermal Technologies for Food Processing. *Front nutr*, **8**, 657090. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.657090>

Jambrak AR, Mason TJ, Lelas V, Herceg Z, Herceg IL (2008) Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *J food eng*, **86(2)**, 281-287. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.10.004>

Joanna B, Michal B, Piotr D, Agnieszka W, Dorota K, Izabela W (2018) Sugar beet pulp as a source of valuable biotechnological products. *Adv biotechnol food ind* (str. 359-392). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811443-8.00013-X>

Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Valko M (2023) Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: Chronic diseases and aging. *Arch toxicol*, **97(10)**, 2499-2574. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9>

Kadam SU, Tiwari BK, O'Donnell CP (2013) Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *J agric food chem*, **61(20)**, 4667-4675. <https://doi.org/10.1021/jf400819p>

Kape R, Chabeau A, Lesage J, Riviere G, Ravallec-Ple R, Lecouturier D i sur. (2006) Production, in continuous enzymatic membrane reactor, of an anti-hypertensive hydrolysate from an industrial alfalfa white protein concentrate exhibiting ACE inhibitory and opioid activities. *Food chem*, **98(1)**, 120-126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.062>

Kara Y, Can Z, Kolaylı S (2022) What should be the ideal solvent percentage and solvent-propolis ratio in the preparation of ethanolic propolis extract?. *Food Anal Methods*, **15(6)**, 1707-1719. <https://doi.org/10.1007/s12161-022-02244-z>

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

Kumar S, Abedin MM, Singh AK, Das S (2020) Role of phenolic compounds in plant-defensive mechanisms. *Plant phenolics in sustainable agriculture* **1**, 517-532. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1\\_22](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_22)



- Lavilla I, Bendicho C (2017) Fundamentals of ultrasound-assisted extraction. In *Water extraction of bioactive compounds* (pp. 291-316). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809380-1.00011-5>
- Leong T, Ashokkumar M, Kentish S (2011) The fundamentals of power ultrasound—A review. *Acoust Aust*, **39(2)**, 54-63.
- Lim ZX, Cheong KY (2015) Effects of drying temperature and ethanol concentration on bipolar switching characteristics of natural Aloe vera-based memory devices. *Phys Chem Chem Phys*, **17(40)**, 26833-26853. <https://doi.org/10.1039/C5CP04622J>
- Ma X, Mei J, Xie J (2021) Mechanism of ultrasound assisted nucleation during freezing and its application in food freezing process. *International J Food Prop*, **24(1)**, 68-88. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1858862>
- Mann J, Truswell S, Hodson L (2023). *Essentials of human nutrition*. Oxford University Press, Oxford str. 56
- Mao H, Bu J, Da X, Chen X, Qiu M, Verweij H, Fan Y (2020) High-performance self-cleaning piezoelectric membrane integrated with in-situ ultrasound for wastewater treatment. *J Eur Ceram Soc*, **40(10)**, 3632-3641. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2020.04.003>
- Maravić N, Teslić N, Nikolić D, Dimić I, Šereš Z, Pavlić B (2022) From agricultural waste to antioxidant-rich extracts: Green techniques in extraction of polyphenols from sugar beet leaves. *Sustain Chem Pharm*, **28**, 100728. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100728>
- Mason TJ, & Cintas P (2002) Sonochemistry. *Handbook of Green Chemistry and Technology*, 372-396.
- Mintah BK, He R, Agyekum AA, Dabbour M, Golly MK, Ma H (2020) Edible insect protein for food applications: Extraction, composition, and functional properties. *J Food Proc Eng*, **43(4)**, 13362. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13362>
- Mnayer D, Fabiano-Tixier AS, Petitcolas E, Ruiz K, Hamieh T, Chemat F (2017) Extraction of green absolute from thyme using ultrasound and sunflower oil. *Resource-Efficient Technol*, **3(1)**, 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.01.007>
- Moyer JD, Hedden S (2020) Are we on the right path to achieve the sustainable development goals?. *World Dev*, **127**, 104749. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.01.007>
- Munteanu IG, Apetrei C (2021) Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *Int j mol sci*, **22(7)**, 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Ng HS, Kee PE, Yim HS, Chen PT, Wei YH, Lan JCW (2020) Recent advances on the sustainable approaches for conversion and reutilization of food wastes to valuable bioproducts. *Bioresource technol*, **302**, 122889. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122889>
- Nynäs AL (2018) White proteins from green leaves in food applications. *Crop Production Science*, 1.
- Oprescu EE, Enascuta CE, Radu E, Ciltea-Udrescu M, Lavric V (2022) Does the ultrasonic field improve the extraction productivity compared to classical methods—Maceration and reflux distillation?. *Chem Eng Process-Process Intensification*, **179**, 109082. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2022.109082>
- Orašćanin A (2023) *Ultrazvučna ekstrakcija proteina i fenolnih spojeva iz suhog lista šećerne repe* (Diplomski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:267537>

Pabón-Baquero LC, Otálvaro-Álvarez ÁM, Fernández MRR, Chaparro-González MP (2018) Plant Extracts as Antioxidant Additives for Food Industry. InTech. doi: 10.5772/intechopen.75444

Nick Pace C, Trevino S, Prabhakaran E, Martin Scholtz J (2004) Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. *Philos T R Soc Lond B*, **359(1448)**, 1225-1235. <https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1500>

Palos-Hernández A, Fernández MYG, Burrieza JE, Pérez-Iglesias JL, González-Paramás AM (2022) Obtaining green extracts rich in phenolic compounds from underexploited food by-products using natural deep eutectic solvents. Opportunities and challenges. *Sustain chem pharm*, **29**, 100773. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100773>

Panadare DC, Gondaliya A, Rathod VK (2020) Comparative study of ultrasonic pretreatment and ultrasound assisted three phase partitioning for extraction of custard apple seed oil. *Ultrason Sonochem*, **61**, 104821. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100773>

Panzella L, Moccia F, Nasti R, Marzorati S, Verotta L, Napolitano A (2020) Bioactive phenolic compounds from agri-food wastes: An update on green and sustainable extraction methodologies. *Front nutr*, **7**, 60. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00060>

Patelski P, Berłowska J, Dziugan P, Pielech-Przybylska K, Balcerek M, Dziekonska U, Kalinowska H (2015) Utilisation of sugar beet bagasse for the biosynthesis of yeast SCP. *J Food Eng*, **167**, 32-37. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.03.031>

Pisoschi AM, Pop A, Iordache F, Stanca L, Predoi G, Serban AI (2021) Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. *Eur J Med Chem*, **209**, 112891. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>

Proserpio C, Fia G, Bucalossi G, Zanoni B, Spinelli S, Dinnella C i sur. (2020) Winemaking byproducts as source of antioxidant components: Consumers' acceptance and expectations of phenol-enriched plant-based food. *Antioxidants*, **9(8)**, 661. <https://doi.org/10.3390/antiox9080661>

Rule DC, Koch DW, Jones RR, Kercher CJ (1991) Brassica and Sugarbeet Forages for Lambs—Growth Performance of Lambs and Composition of Forage and Dock-Fat Fatty Acids. *J prod agric*, **4(1)**, 29-33. <https://doi.org/10.2134/jpa1991.0029>

Rumpf J, Burger R, Schulze M (2023) Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. *Int J Biol Macromol*, **233**, 123470. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123470>

Sanchez OJ, Cardona CA (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource technol*, **99(13)**, 5270-5295. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.013>

Santamaría-Fernández M, Lübeck M (2020) Production of leaf protein concentrates in green biorefineries as alternative feed for monogastric animals. *Anim Feed Sci Tech*, **268**, 114605. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114605>

Sayin HU (2019) Getting high on dopamine: Neuro scientific aspects of pleasure. *SexuS J*, **4**, 883-906. <http://www.sexusjournal.com/>

Schneider Y, Zahn S, Schindler C, Rohm H (2009) Ultrasonic excitation affects friction interactions between food materials and cutting tools. *Ultrasonics*, **49(6-7)**, 588-593. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2009.03.001>

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

- Sharmila G, Nikitha VS, Ilaiyarasi S, Dhivya K, Rajasekar V, Kumar NM i sur. (2016) Ultrasound assisted extraction of total phenolics from *Cassia auriculata* leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Ind crop Prod*, **84**, 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.010>
- Shen L, Pang S, Zhong M, Sun Y, Qayum A, Liu Y i sur. (2023) A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. *Ultrason Sonochem*, 106646. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106646>
- Shirsath SR, Sonawane SH, Gogate PR (2012) Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chem Eng Process: Process Intensification*, **53**, 10-23. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.01.003>
- Shortle E, O'grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat sci*, **98(4)**, 828-834. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>
- Singla M, Sit N (2021) Application of ultrasound in combination with other technologies in food processing: A review. *Ultrason Sonochem*, **73**, 105506. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105506>
- Singleton VL, Rossi, JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, **16(3)**, 144-158. [10.5344/ajev.1965.16.3.144](https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144)
- Subroto E, Lembong E, Filianty F, Indiarto R, Primalia G, Putri MSKZ i sur. (2020) The analysis techniques of amino acid and protein in food and agricultural products. *Int. J. Sci. Technol. Res*, **9(10)**, 29-36.
- Taha A, Mehany T, Pandiselvam R, Anusha Siddiqui S, Mir NA, Malik MA i sur. (2024) Sonoprocessing: mechanisms and recent applications of power ultrasound in food. *Crit rev food sci nutr*, **64(17)**, 6016-6054. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2161464>
- Tenorio AT (2017) *Sugar beet leaves for functional ingredients* (Doctoral dissertation, Wageningen University and Research).
- Tomaszewska J, Bieliński D, Binczarski M, Berłowska J, Dziugan P, Piotrowski J i sur. (2018) Products of sugar beet processing as raw materials for chemicals and biodegradable polymers. *RSC advances*, **8(6)**, 3161-3177. <https://doi.org/10.1039/C7RA12782K>
- Trovaslet M, Kapel R, Ravallec-Plé R, Mouni F, Clarisse M, Faille C i sur. (2007) Secretagogue and bacteriostatic active fractions derived from a peptic hydro-lysate of alfalfa RuBisCO small purified subunit. *J Sci Food Agric*, **87(3)**, 534-540. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2754>
- Udenigwe CC, Okolie CL, Qian H, Ohanenye IC, Agyei D, Aluko RE (2017) Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase as a sustainable and promising plant source of bioactive peptides for food applications. *Trends Food Sci Tech*, **69**, 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.001>
- Van Dijk M, Morley T, Rau ML, Saghai Y (2021) A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050. *Nat Food*, **2(7)**, 494-501. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00322-9>
- Villadsen J (2009). The sugar industry: The cradle of modern Bio-Industry ((Biotech Highlight)). *Biotechnol J*, **4(5)**, 620-n. doi: 10.1002/biot.200800318
- Wadhwa M, Bakshi MPS (2016) Application of waste-derived proteins in the animal feed industry. In *Prot byproducts* (str. 161-192). Academic press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802391-4.00010-0>

- WCED (1987) Our Common Future, Brundtland Report. Brundtland. <https://doi.org/10.1002/jid.3380010208>
- Wen C, Zhang J, Yao H, Zhou J, Duan Y, Zhang H i sur. (2019) Advances in renewable plant-derived protein source: The structure, physicochemical properties affected by ultrasonication. *Ultrason Sonochem*, **53**, 83-98. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.12.036>
- Wen C, Zhang J, Zhang H, Dzah CS, Zandile M, Duan Y i sur. (2018) Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops—A review. *Ultrason sonochem*, **48**, 538-549. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018>
- Yavuz S, Yavuz IG (2024) The Importance of Animal Proteins for Human Nutrition. *Altern Prot Sourc*, **182**, 10.
- Yuan WL, Yang X, He L, Xue Y, Qin S, Tao GH (2018) Viscosity, conductivity, and electrochemical property of dicyanamide ionic liquids. *Front chem*, **6**, 59. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00059>
- Zeb A (2020) Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochem*, **44(9)**, 13394. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13394>
- Zewail RMY, El-Gmal IS, Khaitov B, El-Desouky HS (2020) Micronutrients through foliar application enhance growth, yield and quality of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J Plant Nutr*, **43(15)**, 2275-2285. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1771580>
- Zhang W, Grimi N, Jaffrin MY, Ding L, Tang B (2017) A short review on the research progress in alfalfa leaf protein separation technology. *J Chem Technol Biotechnol*, **92(12)**, 2894-2900. <https://doi.org/10.1002/jctb.5364>
- Zhou L, Zhang J, Xing L, Zhang W (2021) Applications and effects of ultrasound assisted emulsification in the production of food emulsions: A review. *Trends Food Sci Technol*, **110**, 493-512. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.008>
- Zhou N, Thilakarathna WW, He QS, Rupasinghe HV (2022) A review: depolymerization of lignin to generate high-value bio-products: opportunities, challenges, and prospects. *Front Energy Research*, **9**, 758744. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.758744>
- Zhou Y, Tian Y, Yang B (2023) Root vegetable side streams as sources of functional ingredients for food, nutraceutical and pharmaceutical applications: The current status and future prospects. *Trends Food Sci Technol*, **137**, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.05.006>
- Zicari S, Zhang R, Kaffka S (2019) Sugar beet. In *Integ process technol food agric byprod* (str. 331-351). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814138-0.00013-7>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Sven Kovačiček 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