



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Vedran Biondić Fučkar

**OPTIMIZIRANJE PROCESA ODRŽIVE
ULTRAZVUČNE I MIKROVALNE
EKSTRAKCIJE PROTEINA IZ
SREBRNE POKOŽICE KAVE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Vedran Biondić Fučkar

**OPTIMIZIRANJE PROCESA ODRŽIVE
ULTRAZVUČNE I MIKROVALNE
EKSTRAKCIJE PROTEINA IZ
SREBRNE POKOŽICE KAVE**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Dr. sc. Anet Režek Jambrak, red. prof.
Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, red. prof.

Zagreb, 2025.



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Vedran Biondić Fučkar

**OPTIMIZING THE PROCESS OF SUSTAINABLE
ULTRASONIC AND MICROWAVE PROTEIN
EXTRACTION FROM COFFEE SILVERSKIN**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Professor Anet Režek Jambrak, Ph. D.

Professor Dubravka Vitali Čepo, Ph. D.

Zagreb, 2025

Ovaj doktorski rad je izrađen u Zavodu za opće programe, Laboratoriju za održivi razvoj Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta i na Zavodu za prehranu i dijetoterapiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja znanstvenog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

ZAHVALE

Zahvaljujem svojim dragim mentoricama, prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak i prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo što su me uvijek saslušale, pomogle, savjetovale i poticale na promišljanje o ovoj aktualnoj temi i u izradi cijelog rada koji je izrazito kompleksan i zahtjevan u eksperimentalnom dijelu.

Posebno zahvaljujem prof. dr. sc. Iliji Đekiću na nesebičnoj pomoći i vremenu u pomaganju oko kompleksnog dijela s LCA analizama.

Hvala kolegama i zaposlenicima Laboratorija za održivi razvoj Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu na strpljenju i podršci u pronalasku najnovijih istraživanja i radova.

Također zahvaljujem dragom dr. sc. Ognjenu Ožegiću na čitanju ovog rada i jezičnim savjetima kod formiranja teksta, ali i u kontroli kemijskog dijela kave jer mu je kava oduvijek jako interesantna.

Zahvaljujem se i svojim prijateljima koji su se uključili svojom stručnom pomoći na tehničkom uređenju i lektoriranju teksta.

Najveće hvala mojoj obitelji - na svemu!

SAŽETAK

Srebrna pokožica kave (SPK) je nusproizvod klasičnog procesa prerade kave i potencijalni je izvor nutritivno važnih spojeva (proteina, peptida, polifenola, prehrambenih vlakana i sl.) s velikim mogućnostima primjene u razvoju funkcionalnih proizvoda. Kako bi proces iskorištavanja SPK, ali i sekundarnih sirovina općenito, bio što održiviji te u skladu s ciljevima održivog razvoja, vrlo je važno u tom smislu kontinuirano istraživati i unaprjeđivati mogućnosti korištenja održivih tehnologija među kojima se posebno ističu ultrazvučna ekstrakcija (UAE) i mikrovalna ekstrakcija (MAE). Osnovni ciljevi predloženog istraživanja bili su istražiti primjenjivost iskorištavanja SPK kao sekundarne sirovine, a s obzirom na njezin kemijski sastav i zdravstvenu ispravnost, ispitati mogućnosti primjene UAE i MAE u ekstrakciji proteina i peptida iz SPK, okarakterizirati dobivene ekstrakte s obzirom na prinose ciljnih komponenti i udjele drugih bioaktivnih sastavnica te odrediti ukupni ekološki otisak optimiziranih ekstrakcijskih procesa. Rezultati istraživanja pokazali su da se s obzirom na ostatke pesticida i teških metala SPK može smatrati zdravstveno ispravnom te je ona u tom smislu iskoristiva kao sekundarna sirovina u prehrambenoj industriji. Optimizacijom UAE/MAE pokazano je da sva tri istraživana parametra - amplituda ultrazvuka/snaga mikrovalova (A), vrijeme ekstrakcije (B) i njihov međusobni odnos (AB), imaju značajan utjecaj na promjenu udjela ukupnih proteina. Najveći prinos proteina ($1,10 \pm 0,08$ mg/L) dobiven je primjenom UAE (3 min/100 %). U slučaju MAE prinosi proteina bili su značajno niži - najveći postignuti prinos bio je $0,77 \pm 0,07$ mg/L (9 min/200 W). Ekstrakti su sadržavali sve esencijalne aminokiseline što ukazuje na prihvatljivu kvalitetu proteina i potencijal za upotrebu u ljudskoj prehrani. Raspon veličina tri glavne identificirane skupine proteina kretao se od 15,7 kDa do 70,2 kDa pri čemu je najmanji protein sadržavao Barwinovu domenu što ukazuje na potencijal za dobivanje bioaktivnih peptida. Ekstrakti SPK sadržavali su značajne količine polifenolnih spojeva, neovisno o primijenjenim uvjetima ekstrakcije. Značajno veća potrošnja energije MAE u usporedbi s UAE doprinijela je znatno višem potencijalu globalnog zatopljenja (GWP) te ekstrakcijske tehnike odnosno GWP ekstrakcijskog procesa iznosio je 15,5 g CO₂e za MAE naspram 4,95 g CO₂e za UAE. Ukupan GWP postupka izdvajanja proteina iz SPK primjenom UAE iznosio je 509,5 g CO₂e/kg otpada u slučaju odlaganja otpada na deponij, uz mogućnost dodatnog smanjenja na 231,0 g CO₂e/kg otpada u slučaju kompostiranja preostalog otpadnog materijala. Dobiveni rezultati predstavljaju značajan doprinos trenutačnim i ograničenim saznanjima o mogućnostima korištenja SPK kao izvora proteina i biološki vrijednih peptida te pružaju originalan uvid u potencijal globalnog

zatopljenja procesa i ponovnog iskorištavanja SPK, a ovisno o primijenjenim ekstrakcijskim postupcima i upravljanju preostalim otpadnim materijalom.

Ključne riječi: srebrna pokožica kave (SPK); ultrazvučna ekstrakcija (UAE); mikrovalna ekstrakcija (MAE); optimizacija; proteini; polifenoli; potencijal globalnog zatopljenja (GWP)

SUMMARY

Background. Coffee silverskin (CSS) is a by-product of the classic coffee processing and a potential source of nutritionally important compounds with great application potential in the development of functional products (e.g. proteins, peptides, polyphenols and dietary fibres). To improve the sustainability of CSS reuse (and the reuse of secondary raw materials in general) and to be in line with the sustainable development goals it is necessary to research and improve the possibilities of the use of green technologies, such as ultrasonic extraction (UAE) and microwave-assisted extraction (MAE), mainly to reduce extraction time and/or energy consumption while simultaneously reducing the use of extraction solvents. The main goals of the proposed research were to investigate the possibilities of applying UAE and MAE in the extraction of proteins from CSS and to characterize obtained extracts with regard to protein yields and structural characteristics of major protein classes (1); the proportion of other bioactive components in obtained extracts (2); and the overall ecological footprint of the optimized UAE/MAE processes applied for obtaining the CSS extracts (3).

Methods. Once the roasting of coffee was completed, the by-product - CSS was collected and further utilized in the research. Samples were obtained from Franck Ltd. (Zagreb, Croatia) and contained a mixture of 2 blends of coffee - *Coffea robusta* and *Coffea arabica*. Samples were provided in the briquette form and were processed into powder to expedite the analyses. The experimental part of this research was divided into three parts. In the first part of investigation health safety of CSS was investigated, with the aim of determining its applicability as a secondary raw material in food industry. In the second part of investigation UAE and MAE extraction processes for obtaining proteins from CSS were optimized and compared, focusing on the protein yield as the main output parameter. Extracts obtained under optimized conditions were characterized in terms of polyphenol content (1); amino acid composition (2); and content and structural characteristics of target peptides (3). In the third part of investigation the environmental footprints of the UAE/MAE processes for obtaining protein extracts from CSS were assessed and compared by the life cycle assessment (LCA) approach. The calculations

were based on obtained experimental data and additional data obtained from the industry and the chosen environmental footprint used was the Global Warming Potential (GWP). In the framework of health safety investigations CSS was analyzed for pesticide- and heavy metal residues. For pesticide determination extraction was conducted by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) method. After that, pesticide residues were quantified by gas- or liquid chromatography coupled to a triple quadrupole (QqQ) mass spectrometry (GC-MS/MS, LC-MS/MS). Regarding the heavy metals, CSS was digested using MAE digestion and concentrations of metals were assessed by inductively coupled plasma coupled to a mass spectrometer as a detector (ICP-MS). MAE was performed by using a closed microwave extraction system and UAE was performed with the probe using deionized water as extraction agent. For the design of the experiment the input parameters were time (3, 6 and 9 min) and ultrasound probe amplitude (50, 75 and 100%)/microwave strength (100, 150 or 200 W) with the condition that the temperature should not exceed 40 °C (to prevent protein denaturation). This approach resulted in obtaining a total of 9 MAE/UAE extracts. The main output parameter was the protein yield, while the content of polyphenols was also monitored. Each extraction was performed in duplicate. Protein concentration was determined by the Lowry method which is based on the reaction of Cu^{2+} with peptide bonds of proteins in an alkaline medium, resulting in Cu^{2+} being reduced to Cu^+ that is monitored spectrophotometrically. Quantitative analysis of amino acids was performed using the Waters AccQ•Tag method according to the manufacturer's instructions and included hydrolysis, derivatization of amino acids with AccQ•Fluor derivatization reagent and HPLC quantitative analysis. As a part of protein characterization, gel filtration chromatography and SEC-HPLC analysis were performed where a mixture of proteins with known molecular weight has been used to determine the molecular weight of the samples. Total phenolic content was determined spectrophotometrically by the colorimetric reaction of the Folin-Ciocalteu reagent. In this particular reaction, the reagent, which is a mixture of phosphotungstic and phosphomolybdic acid, reacts with the phenoxide ion from the sample. In the process, the phenoxide ion is oxidized, and mentioned reagent is reduced to tungsten and molybdenum oxides, which are colored blue and can be monitored spectrophotometrically. GWP of the UAE/MAE processes utilized for obtaining CSS extracts was calculated using the life cycle assessment (LCA) method. The main environmental impacts of the processes utilized for obtaining CSS extracts are related to the consumption of electricity, which primarily depends on the power and time required for extraction. For a complete GWP

calculation, it was necessary to additionally collect data on greenhouse gas emissions that occur during different phases of the CSS life cycle. Data were obtained from the CCaLC2 database.

Results. Based on the comparison of the levels of pesticides and heavy metals with maximal permissible concentrations set for food and dietary supplements, CSS samples can be considered safe and applicable for the use as secondary raw material. Out of the 265 pesticides analyzed, only three pesticides were detected in the analyzed samples: flutriafol (0.012 ± 0.002 mg/kg), imidacloprid (0.016 ± 0.002 mg/kg) and piperonyl butoxide (0.002 ± 0.000 mg/kg). Out of the heavy metals analysed, nickel (2.495 ± 0.055 mg/kg) had the highest concentration in the samples used, while lead (0.249 ± 0.077 mg/kg), arsenic (0.107 ± 0.018 mg/kg) and cadmium (0.106 ± 0.002 mg/kg) were present in significantly lower concentrations. Determined concentrations of flutriafol, imidacloprid and piperonyl butoxide residues, as well as nickel, lead, arsenic and cadmium were lower compared to maximal permissible levels. In the second part of investigations UAE and MAE procedures for extraction of proteins from CSS were optimized and compared. The tested conditions ranged from 3-9 min with 50% - 100% amplitude for UAE (samples U1-U9) and 3-9 min with 100-200 W of power for MAE (samples M1-M9). Analysis of variance showed that all factors - ultrasound amplitude/microwave power (A), extraction time (B) and their mutual relationship (AB), had a significant effect on the total protein yields. The highest protein yield (1.10 ± 0.08 mg/L) was obtained by UAE with 3-minute extraction at an amplitude of 100%. In the case of MAE protein yields were significantly lower compared to UAE - the highest yield (0.77 ± 0.07 mg/L) was obtained during 9-minute extraction at 200 W. During extraction optimization, the content of polyphenols in obtained extracts was also monitored, as they are considered as valuable bioactive components for food functionalization. In UAE the highest yield of polyphenols was obtained after 9-minute extraction at 75 % amplitude (525.7 ± 0.03 mg GAE/100 g), and in MAE after 6-minute extraction at 150 W (677.8 ± 0.03 mg GAE/100 g). However, under the mild range of tested conditions (optimized for protein extraction) none of the tested factors (neither the microwave power nor the extraction time) showed significant effect on total polyphenol yields ($p > 0.05$). The influence of the relationship between independent variables (AA, AB, BB) was also examined, but it was not statistically significant ($p > 0.05$). Extracts containing the highest amounts of proteins (both obtained by MAE and UAE) were further submitted to additional determination of amino-acid composition and protein structure. CSS protein extracts contained all essential amino acids indicating acceptable protein quality and

the potential for the use in human nutrition (except no data was obtained for tryptophan (Trp) and cysteine (Cys) due to degradation that occurs during protein hydrolysis). The most abundant amino acids were: Asx (joint concentration of aspartic acid and asparagine) with concentrations of 539.66 and 533.0 $\mu\text{mol/L}$; Pro - with concentrations of 485.6 and 488.5 $\mu\text{mol/L}$; and Glx, (the joint concentration of glutamic acid and glutamine) with concentrations of 403.9 and 440.9 $\mu\text{mol/L}$, independently of the type of the extraction procedure. In the view of the protein characterization, the goal was to determine if isolated proteins contained Barwins domain, in which case they might be considered as potential sources of bioactive peptides (BAPs). BAPs can exhibit antioxidative, antimicrobial, immunomodulatory, and antihypertensive properties, which makes them valuable in terms of developing functional foods aimed at enhancing human health and preventing chronic diseases. Different protein structures were separated on the SDS among which the largest protein mass was 70.2 kDa (uncharacterized protein), and the lowest was 15.7 kDa. The smallest protein (15.7 kDa) contained Barwin's domain which makes it interesting not only nutritionally but also as potential BAPs precursor. Considering the increasing importance of applying sustainable practices and considering the sustainability of proposed methodology, together with its economic benefits, UAE and MAE processes for obtaining protein extracts were also assessed in terms of their GWP. Namely, the bare fact of reusing waste as the source of valuable compounds presents sustainable approach – however techniques applied in that process can differ significantly, particularly in terms of solvent usage, energy consumption and consequently GWP. Our analysis showed significantly higher energy consumption of MAE compared to UAE resulting in higher GWP. The sample M2 with a GWP of 15.50 g CO₂e had the highest GWP. On the other side the highest UAE GWP (sample U3) was 4.95 g CO₂. GWPs obtained for 9 UAE extraction conditions ranged from 131 - 495 g CO₂e/ kg of waste. Analysis showed that GWP increases with an increase in the sample's treatment time and amplitude, but the increase is more intense with increasing time. For reliable calculations, LCA needs to consider the whole life cycle of the product. Since after protein extraction 50% of raw material remains as waste, the total GWP of extracting the bioactive components from CSS and dumping the remains was calculated to be 509.5 g CO₂e/kg waste. In the case of composting the remaining waste, the total GWP can be reduced to 231.0 g CO₂e/kg of waste.

Conclusions. Valorisation of the CSS as a secondary raw material for obtaining polyphenol-rich protein extracts can be considered as sustainable approach based on obtained yields and

GWP of developed processes. In addition to high yields, obtained samples contained proteins with excellent amino acid composition and containing Barwin's domain indicating potential for functional food ingredients. Both UAE and MAE can be applied for extracting proteins from CSS, where UAE results with approximately 30% higher yields compared to optimal MAE results. Additionally, GWP of MAE-assisted extraction is three times higher compared to UAE. Obtained results highlight the need to objectively analyze the "green" aspects of processing techniques, as significant differences exist among them. It also underscores the importance of considering GWP and other ecological footprint markers as key parameters during the development and optimization of processing methodologies.

Keywords: coffee silverskin (CSS); ultrasound-assisted extraction (UAE); microwave-assisted extraction (MAE); optimization; proteins; polyphenols; global warming potential (GWP)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 INDUSTRIJA KAVE KROZ POVIJEST	2
1.2 SREBRNA POKOŽICA KAVE KAO SEKUNDARNA SIROVINA	5
1.3 SREBRNA POKOŽICA KAVE KAO IZVOR PROTEINA	8
1.4 SREBRNA POKOŽICA KAVE KAO IZVOR POLIFENOLA	10
1.5 OSTACI PESTICIDA U SEKUNDARNIM SIROVINAMA	11
1.6 TEŠKI METALI U SEKUNDARNIM SIROVINAMA	13
1.7 MIKROVALNA EKSTRAKCIJA	16
1.7.1 Mehanizam djelovanja mikrovalova	16
1.7.2 Mogućnosti primjene mikrovalova	17
1.8 ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA	19
1.8.1 Mehanizam djelovanja ultrazvuka	19
1.8.2 Uređaji i otapala u ultrazvučnim ekstrakcijama	22
1.9 ŽIVOTNI CIKLUS PROIZVODA	24
1.9.1 Analiza životnih ciklusa	25
1.9.2 Indeks održivosti procesa	26
1.10 KRUŽNO GOSPODARSTVO	26
1.10.1 ISO standardi niza ISO 59000	27
1.10.2 Agenda 2030	29
1.10.3 Ukupni ekološki otisak proizvoda	30
1.10.4. Europski zeleni plan	31
2. OBRAZLOŽENJE TEME	33
3. MATERIJALI I METODE	36
3.1 MATERIJALI	37
3.1.1 Uzorci	37
3.1.2 Kemikalije i standardi	37
3.1.3 Reagensi	38
3.1.4 Instrumenti i uređaji	39
3.1.5 Programski paketi	40
3.2 PLAN ISTRAŽIVANJA I METODOLOGIJA	41
3.2.1 Određivanje zdravstvene ispravnosti srebrne pokožice kave	43
3.2.1.1 Određivanje ostataka pesticida	43
3.2.1.2 Određivanje teških metala	45
3.2.2 Optimizacija ekstrakcije proteina i polifenola iz srebrne pokožice kave postupkom mikrovalne ekstrakcije	48
3.2.3 Optimizacija ekstrakcije proteina i polifenola iz srebrne pokožice kave postupkom ultrazvučne ekstrakcije	49
3.2.4 Određivanje sadržaja i karakterizacija proteina srebrne pokožice kave	52
3.2.4.1 Određivanje ukupnih proteina metodom po Lowryju	52
3.2.4.2 Određivanje aminokiselinskog sastava uzoraka	54
3.2.4.3 Karakterizacija proteina	56
3.2.5 Određivanje ukupnih polifenola srebrne pokožice kave	59
3.2.6 Određivanje potencijala globalnog zatopljenja (GWP) kod procesa dobivanja ekstrakata srebrne pokožice kave	60
4. REZULTATI	62
4.1 ZDRAVSTVENA ISPRAVNOST SREBRNE POKOŽICE KAVE	63
4.1.1 Udio ostataka pesticida	63
4.1.2 Udio teških metala	64
4.2 PRIMJENJIVOST MIKROVALNE EKSTRAKCIJE U REVALORIZACIJI SREBRNE POKOŽICE KAVE	66
4.2.1 Udio i kvaliteta proteina u MAE ekstraktima	66
4.2.1.1 Udio ukupnih proteina u MAE ekstraktima	66

4.2.1.2 Aminokiselinski sastav MAE ekstrakata	70
4.2.1.3 Karakterizacija proteina/peptida u MAE ekstraktima	71
4.2.2. Udio i kvaliteta polifenola u MAE ekstraktima srebrne pokožice kave	73
4.3 Primjenjivost ultrazvučne ekstrakcije u revalorizaciji srebrne pokožice kave	76
4.3.1 Udio i kvaliteta proteina u UAE ekstraktima	76
4.3.1.2 Aminokiselinski sastav UAE ekstrakata	79
4.3.1.3 Karakterizacija proteina/peptida u UAE ekstraktima	80
4.3.2 Udio i kvaliteta polifenola u UAE ekstraktima srebrne pokožice kave	82
4.4 ANALIZA ŽIVOTNIH CIKLUSA	84
4.4.1 GWP ekstrakcije proteina iz srebrne pokožice kave	84
4.4.2 GWP proteinskih ekstrakta srebrne pokožice kave dobivenih optimiziranim procesom ultrazvučne ekstrakcije.....	88
5. RASPRAVA.....	92
5.1 ZDRAVSTVENA ISPRAVNOST SREBRNE POKOŽICE KAVE	93
5.2 VALORIZACIJA SREBRNE POKOŽICE KAVE KAO SEKUNDARNE SIROVINE ZA DOBIVANJE PROTEINA – USPOREDBA MAE I UAE ...	94
5.3 VALORIZACIJA SREBRNE POKOŽICE KAVE KAO SEKUNDARNE SIROVINE ZA DOBIVANJE POLIFENOLA – USPOREDBA MAE I UAE	99
5.4 UGLJIČNI OTISAK DOBIVANJA PROTEINSKOG EKSTRAKTA SREBRNE POKOŽICE KAVE – VAŽNOST PROCESA EKSTRAKCIJE I UPRAVLJANJA OTPADOM	103
6. ZAKLJUČCI	109
7. POPIS LITERATURE	112
8. POPIS KRATICA.....	126
9. PRILOZI	128
10. ŽIVOTOPIS.....	169

1. UVOD

1.1 Industrija kave kroz povijest

Industrija kave ima dugu i raznoliku povijest. Potječe iz Etiopije, gdje su prvi put zabilježene divlje biljke kave. Prema legendi, otkrivena je oko 9. stoljeća kada je pastir primijetio da njegove koze postaju živahnije nakon što su jele plodove kave. Svoje je saznanje potom rekao jednom redovniku koji je iste plodove odlučio osušiti i skuhati te je tako nastala kava. Radi njezina okusa i učinka koji je ostavljala, jer su s lakoćom mogli ostati budnima tijekom noćne molitve, počeli su je piti svi redovnici u zemlji. Legende muslimanskoga svijeta se uglavnom povezuju uz šejhove i sufijske redove, koji su zapravo bili i prvim učestalim korisnicima kave, a koji su je isto tako upoznali s većom populacijom ljudi (1).

Arapska riječ „qahwa“ koristila se kao osnovna riječ za „crni napitak“ u mnogim drugim jezicima. Tako je u europske jezike arapska riječ za kavu (engl. *coffee*, fr. *café*, niz. *koffie*, tal. *caffè*, njem. *kaffee*, srp. *kafa*) prihvaćena posredstvom iz izvornog osmanskog turskog jezika. Međutim, etimologija ove riječi izazvala je dosta rasprava. Riječ qahwa ima nešto dužu povijest uporabe s obzirom na to da je korištena kao jedan od epiteta za vino jer arapski korijen q-h-w/y nosi značenje „onoga što umanjuje želju za nečim“ (1).

Kava je kasnije donesena u Aziju, gdje se je počela uzgajati u zemljama poput Indije, Indonezije i Vijetnama. U 17. i 18. stoljeću Nizozemci i Francuzi počeli su uzgajati kavu u svojim kolonijama u Aziji. Kasnije, u 18. stoljeću, kava je donesena u Ameriku. Brazil je postao jedan od najvećih tradicionalnih proizvođača kave nakon što je donesena iz Europe u 18. stoljeću. Kava se također počela uzgajati u drugim zemljama Južne i Srednje Amerike poput Kolumbije, Kostarike i Gvatemale.

Tijekom 19. stoljeća razvijene su nove metode prženja i pripreme kave, uključujući prženje na industrijskoj razini i izum espresso aparata. Ovo je stvorilo novu tržišnu potražnju za kavom, posebno u Europi i Sjevernoj Americi.

Industrijska revolucija donijela je inovacije u proizvodnji, distribuciji i pripremi kave. Razvijene su nove tehnologije za prženje, mljevenje i pakiranje, što je omogućilo masovnu proizvodnju i distribuciju. Tijekom 20. stoljeća, razvijeni su globalni trgovinski sustavi za kavu. Nastali su međunarodni trgovinski ugovori i organizacije poput Međunarodne organizacije za kavu (ICO), a kako bi se regulirali međunarodni trgovinski odnosi i cijene. U novije vrijeme, sve veći naglasak stavlja se na važnost korištenja različitih (lokalnih) sorti kave te primjenu održivih praksi kako u uzgoju, tako i u preradi. Pojavljuju se različiti

certifikati poput primjerice Fair Trade-a koji jamče da je kava uzgojena i prerađena uz poštivanje svih principa održivosti.

Kako bi se zadovoljile promjenjive potrebe tržišta i postigla održivost u cijelom lancu opskrbe neprestano se istražuju nove tehnologije i pristupi u preradi kave. Kava ima dugačak proizvodni i distribucijski lanac koji uključuje proizvodnju, izvoz, uvoz, prženje, distribuciju i maloprodaju. Izvoz kave je industrija vrijedna 20 milijardi dolara, što je čini drugom robom kojom se najviše trguje - uglavnom se izvozi u industrijalizirane zemlje, dok je proizvodnja uglavnom smještena u slabije razvijenim zemljama te je od vitalnog značaja za ekonomiju mnogih zemalja u razvoju. Industrija kave monopolizirana je od strane velikih transnacionalnih korporacija i lanaca - prodaje se navedenim korporacijama po standardnoj stopi koju određuje međunarodna agencija New York Coffee Exchange. Industrija kave ima dugu povijest koja se može pratiti sve do 15. stoljeća kada je Etiopija izvozila kavu u Jemen, a trgovina se kasnije proširila na Egipat i Otomansko carstvo. Uspostavom trgovinskih odnosa između Republike Venecije i Otomanskog carstva, kava je uvedena u Europu, šireći se u Englesku, Francusku, Njemačku, Austriju i Nizozemsku. Tijekom europske kolonijalne ekspanzije, kava je donesena u Ameriku i Aziju te u Južnoj Americi i Indiji postaje jedna od najvažnijih industrijskih grana. I danas su vodeći proizvođači kave države južnoameričkog kontinenta (1).

Kava je naziv za plodove i sjemenke biljke roda *Coffea*, općenito uzgojenih vrsta, kao i proizvoda od ovih plodova u različitim fazama proizvodnje i uporabe, pripremljenih za potrošnju. Kavovci (*Coffea sp.*) su zimzeleni grmovi koji mogu narasti u visinu čak do 10 metara, dok je prosječna visina oko 5 metara. Korijenov sustav se sastoji od dubokog primarnog korijena i sekundarnih, bočnih korijena koji osiguravaju stabilnost i apsorpciju hranjivih tvari.

Kod uzgoja u plantažama često se razvija plići korijen zbog kultivacijskih metoda. Cvjetovi su im nježno-bijele boje, a iz njih se razvijaju zeleni plodovi koji sazrijevanjem poprimaju žutu te potom crvenu do eventualno crne boje (Slika 1). Svaki plod obično sadrži dva sjemenka (zrna kave), rijetko jedno (2). Ekonomski najznačajnije vrste kave su opisane u nastavku.



Slika 1. Grm biljke kave - svježi izdanci na grančicama sa cvjetovima (A,B) i plodovima kave (C) (*C. arabica*; tek iznikli listovi su tamniji od starijih) (3)

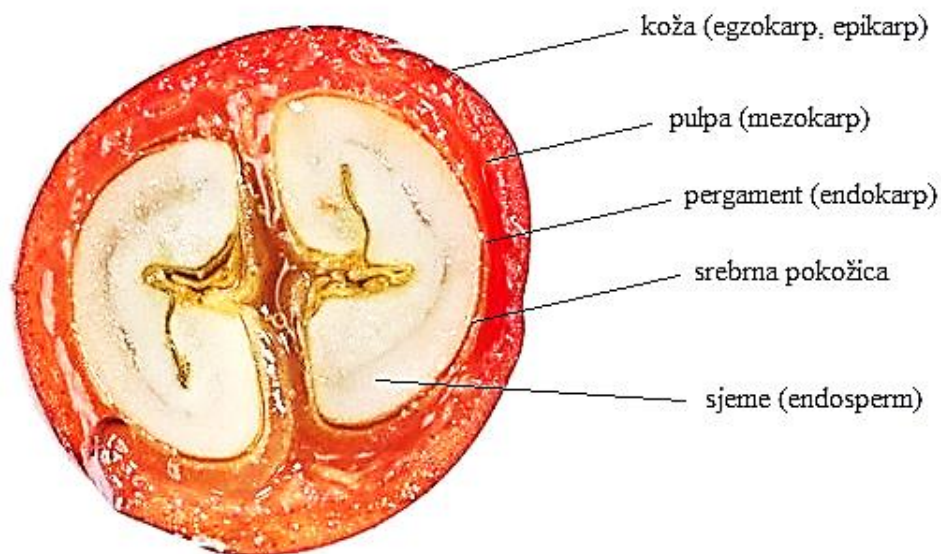
Coffea arabica (Arabica) porijeklom je iz Etiopije i čini oko 60 do 70 % svjetske proizvodnje kave. Karakterizira ju manja gorčina, bogatiji okus i veća raznolikost aroma. Biljke su osjetljivije na bolesti i zahtijevaju pažljiviji uzgoj. Raste na višim nadmorskim visinama (600–2000 m) u zemljama Latinske Amerike, Afrike i Azije, u uvjetima umjerene klime s prosječnim temperaturama od 15 do 24 °C.

Coffea canephora (Robusta) porijeklom je iz zapadne i središnje Afrike i čini oko 30 do 40 % svjetske proizvodnje. Ima snažniji, gorči okus te viši udio kofeina u odnosu na Arabicu. Otpornija je na bolesti i nepovoljne uvjete. Podnosi temperature od 24 do 30 °C i uzgaja se na nižim nadmorskim visinama (<800 m), uglavnom u zemljama poput Vijetnama, Brazila i Indonezije.

Coffea liberica (Liberica) porijeklom je iz Liberije i zapadne Afrike. Rijetko se koristi u komercijalnoj proizvodnji zbog specifičnog okusa. Ima veće plodove i veća kavna zrna. Uzgaja se u Maleziji, na Filipinima i u zapadnoj Africi.

Coffea excelsa (podvrsta Liberice) ima bogat voćni okus, često se koristi za miješanje s drugim vrstama. Ograničena je na specifične regije poput Čada i jugoistočne Azije.

Na **Slici 2** je prikazan presjek ploda kave i njegovi dijelovi. Vanjski sloj ploda naziva se kožica (egzokarp, epikarp), a ispod nje nalazi se mekana i mesnata pulpa (mezokarp). Ispod mezokarpa je endokarp ili pergamentna ljuska koji služi kao tanki polisaharidni pokrov koji obuhvaća dvije sjemenke koja su još dodatno prekrivena srebrnom pokožicom (4).



Slika 2. Građa ploda kave (vlastita ilustracija)

1.2 Srebrna pokožica kave kao sekundarna sirovina

Srebrna pokožica kave (SPK) ili suha sjemena ovojnica (tegument) (Slika 3) tanak je sloj koji izravno pokriva sjemenku kave. Srebrnastog je ili bakrenastog izgleda te predstavlja oko 4,2 % mase sjemenke (4). Tijekom postupka prženja sjemenka se širi i taj tanki sloj se odvaja te postaje jedan od glavnih nusproizvoda prženja kave. SPK je u usporedbi s ostalim nusproizvodima kave relativno stabilan proizvod zbog nižeg udjela vlage (5-7 %). Iako se trenutačno ovaj nusproizvod uglavnom koristi kao gorivo ili se kompostira i koristi za gnojidbu, on istodobno predstavlja i dobar izvor različitih bioaktivnih spojeva s potencijalom primjene u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (5).



Slika 3. Srebrna pokožica kave (SPK) (vlastita fotografija)

SPK sadrži velike količine ukupnih prehrambenih vlakana (oko 62 %), od čega 15 % čine topljiva vlakna, a ostatak od 85 % čine netopljiva vlakna. Od netopljivih vlakana prevladavaju celuloza, lignin i hemiceluloza (2, 4). Nije dokazana značajna razlika u sadržaju prehrambenih vlakana u SPK *C. arabica* i *C. canephora*. Zbog velike količine prehrambenih vlakana otvara se mogućnost korištenja SPK kao sirovine za razvoj funkcionalne hrane (4). Proteini su u SPK prisutni u značajnijim koncentracijama od oko 18 %. Ostali nutrijenti, kao što su masti, pronađeni su u nižim koncentracijama (5). Udio kofeina u SPK nakon prženja kreće se između 0,8 i 1,4 g/100 g, što je usporedivo s količinom kofeina u zrnu kave (1,0-1,2 % u *C. arabica*, 1,6-2,5 % *C. robusta*) (6). Udio minerala u SPK je visok – najzastupljeniji minerali su kalij, magnezij i kalcij (oko 5 g, 2 g i 0,5 g na 100 g SPK). Osim kalija, magnezija i kalcija u SPK mogu se pronaći i razni drugi minerali kao što su željezo, mangan, bakar, fosfor, aluminij i drugi (7).

SPK je bogata fenolnim spojevima, uglavnom klorogenskom kiselinom. Koncentracija polifenola u SPK je manja u usporedbi s prženim zrnom kave vjerojatno zbog utjecaja visoke temperature na vanjski sloj zrna tijekom prženja zbog čega dolazi do brze razgradnje fenolnih spojeva (8).

Dosadašnja istraživanja ukazuju na sigurnost primjene SPK. Akutna toksičnost vodenog ekstrakta SPK istraživana je na štakorima u dozi od 2000 mg/kg u radu Iriondo-DeHond i sur. (8) te nisu utvrđeni nikakvi znakovi toksičnosti, abnormalnog ponašanja ili povećanja smrtnosti. Ekstrakt također nije pokazao citotoksičnost u *in vitro* istraživanjima na HepG2 stanicama. S obzirom na sve navedeno, SPK je nusproizvod industrije s velikim potencijalom primjene u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (5). SPK bi

se zbog svog sastava mogla koristiti kao izvor prehrambenih vlakana, u pekarskim proizvodima, u proizvodnji napitaka (čaja) ili kao aditiv za aromu dima. Osim toga, ekstrakti SPK mogli bi se koristiti kao prirodne boje i kao izvor prehrambenih vlakana u keksima. Također, mogla bi poboljšati kvalitetu, trajnost i senzorska svojstva kruha. Moguća je i implementacija SPK u funkcionalne antioksidativne napitke sa svrhom kontrole tjelesne mase koje su istraživali Martinez-Saez i sur. (9). SPK je također i potencijalni kandidat za zamjenu sintetskih antioksidansa u kozmetičkim formulacijama, uglavnom zbog svog visokog antioksidativnog potencijala posredovanog visokim udjelom fenolnih spojeva, melanoidina i kofeina (5).

Iskorištavanje SPK trenutno je još uvijek značajnije u drugim industrijskim sektorima. Primjerice, u Italiji se SPK pretvara u pelete i prodaje kao gorivo za grijanje (3). S druge strane, švedska grupa Löfbergs koriste SPK i polipropilen, za stvaranje trajnog i održivog materijala za dizajn proizvode na kojima će se posluživati kava. U cilju postizanja veće održivosti plan im je upotrebljavati polipropilen iz recikliranih vrećica za kavu, čime bi učinili proizvodnju i iskorištavanje nusproizvoda kave 100 % kružnim ciklusom (11).

Isplativost istraživanja SPK ovisi o dosta čimbenika, uključujući potencijalne primjene, tržišnu potražnju, troškove istraživanja i razvoja, tehnološke izazove i konkurenciju na tržištu. Prilikom procjene isplativosti treba razmotriti različite mogućnosti iskorištavanja, uključujući proizvodnju biogoriva, kozmetičke proizvode, prehrambene dodatke, materijale za pakiranje ili industrijske materijale. Dalje je važno provesti analizu tržišta kako bi se utvrdilo postoji li potražnja za proizvodima ili tehnologijama koje bi se razvile iz SPK.

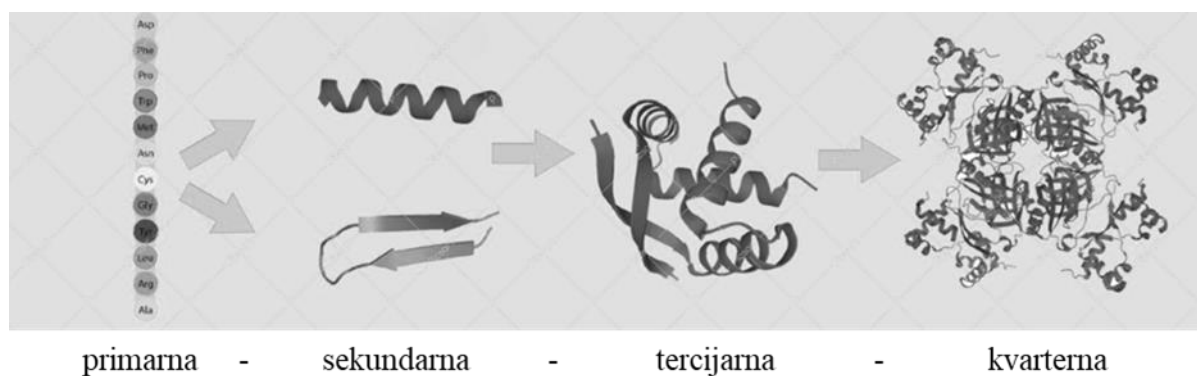
Razvoj tehnologija ili procesa za iskorištavanje SPK može zahtijevati značajna ulaganja u istraživanje i razvoj. Potrebno je procijeniti tehničke izazove i mogućnosti za inovacije kako bi se postigla isplativost, a isto tako treba razmotriti troškove istraživanja, razvoja i komercijalizacije tehnologija ili proizvoda koji se temelje na SPK. Ovi troškovi mogu utjecati na ukupnu isplativost projekta. U obzir treba uzeti i konkurenciju na tržištu i postojeće proizvode ili tehnologije koji se već koriste za slične svrhe. Analiza konkurencije može pomoći u razumijevanju tržišnog potencijala i mogućnosti za otvaranje novih tržišta, drugačijih proizvoda ili suradnju na zajedničkim novim istraživanjima s obzirom na veliki potencijal same sirovine.

Uz sve navedeno, isplativost istraživanja SPK uvelike ovisi o ravnoteži između potencijalnih tržišnih prilika, tehnoloških izazova i troškova razvoja. Potrebno je temeljito

analizirati sve relevantne čimbenike kako bi se donijele informirane odluke o ulaganju u istraživanje i razvoj u ovom području, a što će biti prikazano u nastavku ovog doktorskog rada.

1.3 Srebrna pokožica kave kao izvor proteina

Proteini su polimerne molekule koje čine osnovnu građu svih živih organizama. Nastaju povezivanjem aminokiselina peptidnom vezom u duge lance koji sadrže od 100 do 1000 aminokiselinskih ostataka. Izgrađeni su od aminokiselina koje se sastoje se od centralnog ugljikovog atoma na koji su vezane amino skupina, karboksilna skupina, vodikov atom i bočna skupina (ostatak-R) (12). Građa proteina određena je s četiri različite strukture. Primarna struktura označava redoslijed odnosno sekvenciju aminokiselina u lancu. Međutim, budući da su proteini jako velike makromolekule, njihova građa ne može se odrediti samo slijedom aminokiselina već se mora uzeti u obzir i prostorni raspored molekule (13). Raspored lanaca u prostoru naziva se konformacija proteina. Konformacija proteina se opisuje sekundarnom i tercijarnom strukturom. Sekundarna struktura podrazumijeva prostorni raspored samo glavnih atoma peptidnog lanca, ne uzimajući u obzir bočne ogranke. Dva glavna oblika sekundarne strukture su α – uzvojnica i β – nabrana ploča. Tercijarna struktura podrazumijeva trodimenzionalni prostorni raspored svih atoma polipeptidnog lanca. Kvaternu strukturu čini spajanje više peptidnih lanaca u definiranu molekulu (Slika 4).



Slika 4. Prikaz četiri razine strukture građe proteina (vlastita ilustracija)

Prostorna građa odnosno konformacija proteina ne može se odrediti kemijskom analizom, već fizikalnim i fizikalno – kemijskim metodama. Djelovanjem nekih vanjskih utjecaja, poput temperature, promjene pH vrijednosti otopine, mehaničkih utjecaja i sl., može doći

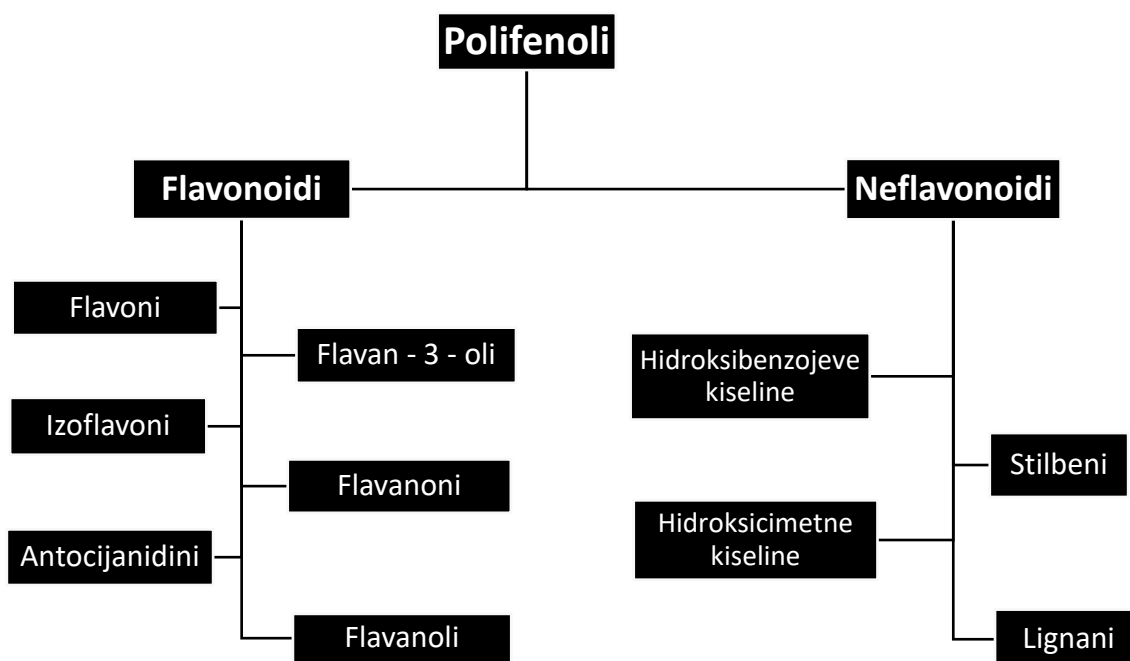
do narušavanja strukture proteina. Ta pojava naziva se denaturacija proteina pri čemu proteini gube svoja biološka svojstva (14).

Količina proteina u SPK može varirati ovisno o različitim čimbenicima kao što su sorta kave, način uzgoja te proces pripreme i obrade zrna kave. S obzirom na prosječni udio proteina u SPK koji varira između 16 i 19 %, SPK se može smatrati dobrim izvorom proteina. Proteini se iz SPK sve više ekstrahiraju i određuju jer imaju veliki potencijal u proizvodnji funkcionalne hrane zbog svojih bioloških funkcija, a i zbog porasta potražnje za alternativnim (biljnim) izvorima kvalitetnih proteina. Osim optimiziranja klasičnih ekstrakcijskih postupaka, danas se razvijaju i suvremene metode ekstrakcije proteina uz pomoć proteaza, gdje se istovremeno odvijaju ekstrakcija i hidroliza proteina, uz eventualnu mogućnost paralelne ekstrakcije i polifenolnih komponenti. Peptidi koji se dobivaju takvim ekstrakcijskim postupcima pokazuju niz poželjnih bioloških učinaka (antioksidacijskog i hipokolesterolemijskog učinka) te ih nazivamo funkcionalnim peptidima. Karakterizira ih kratak lanac aminokiselina te sposobnost da izbjegnu hidrolizu u probavnom traktu i apsorbiraju se intaktni te ostvaruju specifične biološke funkcije u organizmu. Zbog takvih specifičnih svojstava istražuje se njihova primjena u raznim područjima, poput medicine, prehrambene industrije i kozmetike, kako bi poboljšali zdravlje ili specifične funkcije u tijelu (antimikrobni, antihipertenzivni, antioksidativni, imunomodulatorni, kolagen peptidi). Prandi i suradnici (2021) kao moguću ciljanu primjenu proteina i polifenola ekstrahiranih iz SPK navode primjenu kao antioksidacijske komponente kod pakiranja hrane, “anti – age“ primjene u kozmetičkoj industriji te korištenje kao dodataka prehrani zbog svojih antioksidacijskih i antimikrobnih svojstava (15).

SPK se obično ne koristi u ljudskoj prehrani, ali proteini u njoj se mogu iskoristiti kao visoko vrijedni nutrijenti ako se dodaju funkcionalnim proizvodima poput dodataka prehrani ili funkcionalne hrane. Važno je upozoriti da proteini u SPK mogu biti potencijalni alergeni za neke ljude -stoga ako se SPK ne ukloni tijekom obrade kave, postoji mogućnost da bi neki konzumenti mogli imati reakciju na prisutne proteine. U tehnološkom smislu, proteini SPK mogu utjecati na procese fermentacije tijekom obrade kave. Fermentacija može utjecati na okus i aromu kave pa prisutnost proteina u SPK može indirektno utjecati na kvalitetu kave.

1.4 Srebrna pokožica kave kao izvor polifenola

Polifenoli su skupina kemijskih spojeva koji se nalaze u većini biljaka, uključujući voće, povrće, orašaste plodove, sjemenke, čaj, kavu, vino i druge namirnice. Ovi spojevi imaju strukturu koja sadrži više fenolnih skupina što im daje antioksidativna svojstva i druge potencijalne koristi za zdravlje. Polifenoli su velika skupina prirodnih spojeva u biljnom svijetu koja broji više od 8000 različitih polifenola. Djeluju kao jaki antioksidansi i mogu doprinijeti prevenciji kroničnih nezaraznih i autoimunih bolesti. Njihovu strukturu karakterizira najmanje jedan aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina. Osim hidroksilnih, na polifenole mogu biti vezane i sulfatne ili acetilne skupine. U biljkama su polifenoli uglavnom vezani na druge molekule poput ugljikohidrata. Dijele se na dvije velike skupine spojeva - flavonoidne i neflavonoidne spojeve (Slika 5). Flavonoidi su spojevi koji sadrže petnaest ugljikovih atoma unutar dva aromatska prstena povezana s piranskim prstenom. Flavonoidni spojevi se razlikuju po broju i položaju hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije centralnog heterocikličkog prstena, a tu spadaju flavoni, flavon-3-oli, izoflavoni, antocijanidini, flavanoni i flavanoli.



Slika 5. Podjela polifenolnih spojeva (vlastita ilustracija)

Polifenoli su već od ranije poznati kao spojevi koji imaju cijeli niz pozitivnih učinaka na metabolizam i zdravlje čovjeka. Pokazuju antioksidacijsko, antibakterijsko, antimikrobno, antikancerogeno, hipoglikemičko i protuupalno djelovanje. Nedovoljan unos polifenola u organizam povezuje se s povećanjem rizika od kardiovaskularnih bolesti, neurodegenerativnih bolesti, nekih vrsta raka, dijabetesa i osteoporoze (16). Nadalje, polifenoli su najviše istraživani zbog svog antioksidacijskog učinka. Oksidacijski stres nastaje kada dođe do pomaka ravnoteže oksidoredukcijskih reakcija u stanici i to u smjeru oksidacije pri čemu dolazi do porasta broja slobodnih radikala. Polifenoli djeluju kao izvrsni antioksidansi zbog svoje fenolne skupine, koja može primiti elektron i pri tome nastaje fenoksil-radikal koji je relativno stabilan radikal. Tako se zaustavlja naredna lančana redoks-reakcija u stanicama. Također, polifenoli pokazuju pozitivno djelovanje kod kardiovaskularnih oboljenja, gdje ograničavaju aterosklerotička oštećenja tkiva. Smatra se da ateroskleroza nastaje zbog povećanja koncentracije i oksidacije lipoproteina niske gustoće (LDL) u krvi, a polifenoli inhibiraju oksidaciju LDL-a. Razlog pozitivnog utjecaja polifenola na dijabetes je njihov hipoglikemijski učinak. Polifenoli različitim mehanizmima mogu djelovati hipoglikemično, a jedan od načina je inhibicija unosa glukoze u crijevima ili inhibicija unosa u perifernim tkivima (17). Dosadašnja istraživanja su pokazala da SPK sadrži značajne količine polifenola, najviše klorogenske kiseline, iako vrijednosti značajno variraju, ovisno o čimbenicima kao što su vrsta kave i uvjeti prženja (temperatura i trajanje) (15). Visok udio polifenola još je jedna karakteristika kemijskog sastava SPK koje ju čine potencijalno korisnim sastojkom za proizvodnju funkcionalne hrane, dodataka prehrani ili kozmetike. Naime prirodni antioksidansi kao što su polifenoli pomažu u održavanju antioksidativne ravnoteže u organizmu, što može smanjiti rizik od kroničnih bolesti poput kardiovaskularnih bolesti i raka.

1.5 Ostaci pesticida u sekundarnim sirovinama

Pesticidi su spojevi ili kemikalije namijenjeni eliminaciji, suzbijanju ili upravljanju štetnim organizmima koji mogu ugroziti usjeve, biljke, stoku ili druge korisne organizme. Namijenjeni su uništavanju insekata (insekticidi), korova (herbicidi), gljivica (fungicidi), glodavaca (rodenticidi) i raznih mikroorganizama (18).

Primjena pesticida široko je rasprostranjena u poljoprivredi, vrtlarstvu, šumarstvu, suzbijanju štetočina u stambenim i industrijskim okruženjima te u javnom zdravstvu za

kontrolu bolesti koje prenose insekti. Njihova upotreba može biti od koristi jer pomažu u zaštiti usjeva od gubitaka uzrokovanih štetnim organizmima, povećavajući prinos i kvalitetu usjeva te pružajući zaštitu od širenja bolesti. Međutim, pesticidi također mogu imati negativne učinke na okoliš, zdravlje ljudi i druge organizme. S obzirom na učestalost korištenja pesticida izraz pesticid je zapravo postao sinonim za sredstvo za zaštitu bilja, međutim on obuhvaća širi pojam jer se može koristiti i u nepoljoprivredne svrhe. Sredstva za zaštitu bilja su pripravci koji sadržavaju aktivne tvari i dodatne nepesticidne tvari (19). Europska unija ima jedan od najstrožih sustava u svijetu za izdavanje odobrenja i kontrolu upotrebe pesticida. Prema EU zakonodavstvu, sredstva za zaštitu bilja ne smiju se stavljati na tržište bez prethodnog odobrenja, a svaka aktivna tvar sadržana u sredstvu za zaštitu bilja mora se dokazati sigurnom za zdravlje ljudi, životinja i za okoliš. Države članice EU moraju propisati pravilnu uporabu sredstava za zaštitu bilja. Pravilna uporaba uključuje primjenu načela dobre poljoprivredne prakse kao i načela integrirane kontrole. Potrebno je osigurati da ostaci pesticida ne budu prisutni u razinama koje predstavljaju neprihvatljivi rizik za ljude i, gdje je to bitno, za životinje. Maksimalna razina ostataka (MRO) je najviša razina ostataka pesticida koja je zakonom dozvoljena u ili na hrani ili hrani za životinje, a potrebno ju je utvrditi na najnižoj prihvatljivoj razini u skladu s dobrom poljoprivrednom praksom za svaki pesticid radi zaštite ranjivih skupina poput djece i trudnica. Najbitnija odredba za dopuštene granice pesticida je Uredba (EZ) br. 396/2005 (posljednja ažurirana verzija od 11. svibnja 2024.) (20). Tom uredbom utvrđuju se najveće dopuštene količine ostataka pesticida u proizvodima životinjskog ili biljnog podrijetla namijenjenima prehrani ljudi ili kao hrana za životinje te uključuju ili MRO vrijednosti karakteristične za određene proizvode namijenjene za prehranu ljudi ili kao hrana za životinje ili općenite MRO vrijednosti koje se primjenjuje ako ne postoji MRO definiran za specifičnu skupinu proizvoda.

Nepropisna primjena ili izlaganje previsokim razinama pesticida može uzrokovati akutne ili kronične zdravstvene probleme, uključujući iritaciju kože i oči, glavobolje, vrtoglavicu, mučninu i dugoročne zdravstvene probleme poput neuroloških poremećaja i raka. Osim toga, pesticidi imaju i veliki utjecaj i na onečišćenje okoliša. Uzrokuju onečišćenje tla, voda i zraka te imaju štetne učinke na biljni i životinjski svijet, uključujući smanjenje bioraznolikosti. Naime, pesticidi nemaju usko selektivne učinke te negativno djeluju i na korisne organizme poput pčela, ptica, riba i drugih predatora štetnika, a što može imati dalekosežne posljedice na ekosustave. Učestala uporaba pesticida može dovesti

do pojave rezistentnosti kod ciljanih štetnih organizama, što zahtijeva primjenu sve većih količina pesticida ili primjenu novih aktivnih tvari za njihovu kontrolu. Pesticidi i njihovi ostaci mogu ostati u okolišu i tlu dugo vremena nakon primjene, a čime se stvara problem s odlaganjem. Nepravilno odlaganje pesticida ili ispiranje ostataka s polja može dovesti do velike kontaminacije tla i voda te predstavljati rizik za okoliš i ljudsko zdravlje. Zbog tih opasnosti, važno je pravilno upravljati primjenom pesticida, slijedeći smjernice stručnjaka za poljoprivredu i primjenjujući sigurnosne mjere kako bi se smanjili rizici za okoliš i zdravlje ljudi. Također se potiču alternative uporabi pesticida, poput integrirane zaštite usjeva, organskog uzgoja, biološke kontrole štetnika i drugih agrotehničkih mjera.

Ostaci pesticida mogu na različite načine dospjeti u hranu i pitku vodu. Najčešći put kontaminacije je izravna kontaminacija proizvoda kao rezultat korištenja pesticida u poljoprivredi za suzbijanje štetnika na usjevima biljaka. Osim tretiranja biljaka, moguće je i tretiranje životinja kada ih se želi zaštititi od insekata ili drugih štetnika, zbog čega se pesticid izravno može unijeti u organizam životinje i zadržati se u njihovom tkivu. Do kontaminacije hrane može doći i kada u tlu zaostanu pesticidi od prethodnog usjeva koji onda putem korijena dopijevaju u biljku koja je zasađena na istom polju. Ako životinja konzumira tako kontaminirano bilje, onda će se pesticidi zadržati u tkivu životinje zbog čega na koncu imamo kontaminirano meso ili mlijeko. Ostaci pesticida u raznim poljoprivrednim proizvodima se trgovinom mogu transportirati na velike udaljenosti gdje će vjerojatno ponovo dospjeti u okoliš i kontaminirati druge prehrambene proizvode, na primjer kroz proizvodne procese ili kao stočna hrana. Rizik od kontaminacije pesticidima postoji i ako u skladištima i transportnim objektima zaostane pesticida koji bi mogli kontaminirati naknadno uskladištene proizvode (21). Uredbom su obuhvaćeni svi proizvodi namijenjeni za prehranu ljudi ili kao hrana za životinje, a koji su popisani u Prilogu I iste, za koja postoje recentna domaća istraživanja da pesticidi ne prelaze dopuštene razine i ukazuju na važnost održive proizvodnje odnosno održivost staništa i ekosustava lokalnog stanovništva (22).

1.6 Teški metali u sekundarnim sirovinama

U različitim fazama i okolnostima proizvodnog procesa, metali i njihove slitine (legure) dolaze u dodir s hranom i to putem procesne opreme, pripreme (pribora) i čuvanja hrane (npr. metalna ambalaža: folije, limenke, spremnici, kontejneri i sl.). Neki metali u hranu

dospijevaju iz okoliša, odnosno iz vode i tla te se dalje akumuliraju u hranidbenom lancu (23). Ako ukupna koncentracija metala prijeđe preporučena ograničenja to može ugroziti zdravlje potrošača ili dovesti do raznih neželjenih organoleptičkih promjena namirnica.

Teški metali su skupina metala koji se definiraju kao elementi koji imaju gustoću veću od 5 g/cm^3 . Stoga se u tu skupinu ubraja jako velik broj metala od kojih su neki esencijalni za funkcioniranje ljudskog organizma (bakar, cink, mangan, željezo, molibden), dok drugi pokazuju uglavnom štetne učinke (olovo, živa, kadmij, arsen, aluminij, kositar, kobalt, paladij, platina) (24). Teški metali u previsokim koncentracijama imaju štetan utjecaj na biljni i životinjski svijet, a akumulacijom istih preko hranidbenog lanca dolaze do čovjeka (25). U organizam se unose udisanjem, apsorpcijom u probavnom traktu ili kroz kožu, ovisno o njihovom kemijskom obliku te mogu izazvati ozbiljne negativne učinke na zdravlje ljudi (22).

Teški metali koji nisu biogeni i djeluju isključivo toksično uključuju kadmij, olovo i živu, a zbog visokog stupnja toksičnosti značajne negativne učinke na zdravlje mogu imati i arsen i krom. Njihova toksičnost ovisi o različitim čimbenicima, poput doze, načina izlaganja, kemijskog oblika metala, kao i osobnih karakteristika poput dobi, spola i genetike (26). Teški metali pokazuju afinitet za razne ligande organskih molekula, posebice proteina te se lako vezuju za stanične membrane i mijenjaju transmembranski potencijal, blokiraju aktivni transport ili razaraju membransku strukturu (27). Na djelovanje teških metala posebno su osjetljiva tkiva bubrega, jetre i centralnog živčanog sustava (28).

Monitoring teških metala u okolišu u Republici Hrvatskoj definiran je Zakonom o kontaminantima (NN 39/2013 i 114/2018) (29), kojim se utvrđuju nadležna tijela, zadaće nadležnih tijela, službene kontrole i načini postupanja te izvještavanja nadležnih tijela i Europske komisije kao i obveze službenih laboratorija i subjekata u poslovanju s hranom, za provedbu Uredbe komisije (EU) 2023/915 o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani i o stavljanju izvan snage Uredbe (EZ) br. 1881/2006 (30). Među bitnim, u novoj EU uredbi se navodi sljedeće:

1. Uredbom Komisije (EZ) br. 1881/2006 utvrđene su najveće dopuštene količine određenih kontaminanata u hrani. Ta je uredba već mnogo puta znatno izmijenjena, a s obzirom na to da je potreban niz novih izmjena, trebalo bi je zamijeniti.
2. Trebalo bi utvrditi stroge najveće dopuštene količine koje se razumno mogu postići primjenom dobrih poljoprivrednih, ribarstvenih i proizvodnih praksi, uzimajući u obzir rizik povezan s konzumacijom hrane. U slučaju mogućeg rizika za zdravlje, najveće

dopuštene količine kontaminanata trebalo bi utvrditi na najnižoj razini koju je razumno moguće postići (načelo ALARA, engl. *As Low As Reasonably Achievable*). Takvim se pristupom osigurava da subjekti u poslovanju s hranom primjenjuju mjere kojima se u najvećoj mogućoj mjeri sprečava i smanjuje kontaminacija radi zaštite javnog zdravlja. Nadalje, radi zaštite zdravlja dojenčadi i male djece, primjereno je utvrditi najniže najveće dopuštene količine koje se mogu postići strogim odabirom sirovina koje se upotrebljavaju za proizvodnju hrane za tu ranjivu skupinu, prema potrebi u kombinaciji s posebnim proizvodnim praksama. Strogi odabir sirovina primjeren je i za proizvodnju određene hrane koja se stavlja na tržište za krajnjeg potrošača, za koju je radi zaštite ranjivih skupina stanovništva utvrđena stroga najveća dopuštena količina.

3. Radi učinkovite zaštite javnog zdravlja, hrana koja sadržava kontaminante u količinama koje prekoračuju najveće dopuštene količine ne bi se smjela stavljati na tržište kao takva niti upotrebljavati kao sastojak hrane ili miješati s hranom.

4. Kako bi se omogućila primjena najvećih dopuštenih količina na suhu, razrijeđenu, prerađenu i složenu hranu za koju nisu utvrđene posebne najveće dopuštene količine na razini Unije, subjekti u poslovanju s hranom trebali bi nadležnim tijelima dostaviti posebne faktore koncentracije, razrjeđivanja i prerade te, u slučaju složene hrane, omjere sastojaka, zajedno s odgovarajućim eksperimentalnim podacima na temelju kojih su predloženi faktori utvrđeni.

5. Zbog nedostatka toksikoloških podataka i znanstvenih dokaza o sigurnosti metabolita koji nastaju kemijskom detoksikacijom primjereno je zabraniti takvu obradu hrane.

6. Poznato je da se udio kontaminanata u hrani može smanjiti sortiranjem ili drugim fizikalnim postupcima. Kako bi se smanjili učinci na trgovinu, primjereno je za određene proizvode koji se ne stavljaju na tržište za krajnjeg potrošača ili kao sastojak hrane dopustiti više razine kontaminanata. U tim bi slučajevima najveće dopuštene količine kontaminanata trebalo utvrditi uzimajući u obzir koliko se djelotvorno takvim postupcima količina kontaminanata u hrani može smanjiti na razine ispod najvećih dopuštenih količina utvrđenih za proizvode koji se stavljaju na tržište za krajnjeg potrošača ili upotrebljavaju kao sastojak hrane. Kako bi se izbjegla zlouporaba tih viših najvećih dopuštenih količina, primjereno je utvrditi odredbe o stavljanju na tržište, označivanju i uporabi predmetnih proizvoda.

7. Određeni proizvodi se ne upotrebljavaju kao hrana i na njih se u pogledu pojedinih kontaminanata primjenjuju manje stroge najveće dopuštene količine ili se ne primjenjuju

najveće dopuštene količine. Kako bi se omogućila djelotvorna primjena najvećih dopuštenih količina kontaminanata u toj hrani, primjereno je za tu hranu utvrditi odgovarajuće odredbe o označivanju.

Iz navedenog proizlazi potreba za strogim praćenjem i analizom svih kontaminanata, a pravo EU-a osigurava da se poslovni subjekti moraju pridržavati obvezujućih propisa. Propisi mogu imati opći opseg, tj. primjenjivati se na sve materijale i predmete koji dolaze u dodir s hranom ili se primjenjivati samo na posebne materijale. Pravo EU-a se također može nadopuniti s nacionalnim zakonima država članica, ako posebni propisi EU-a ne postoje ili ako su nedovoljno razrađeni. Kako u ovoj uredbi nije izričito propisan dozvoljeni udio teških metala u kavi, a niti u spomenutom domaćem Zakonu o kontaminantima, postoji određena „praznina u legislativi“ u vezi ovih ispitivanja jer nije jasno prema čemu se uzimaju maksimalne dopuštene količine kod analiza pa je utvrđeno da se u praksi još koriste vrijednosti iz prethodnog važećeg Pravilnika. Prema njemu je u kavi najviša dopuštena količina (NDK) metala ili metaloida za olovo (Pb) 1,0 mg/kg, a za arsen (As) također 1,0 mg/kg (31).

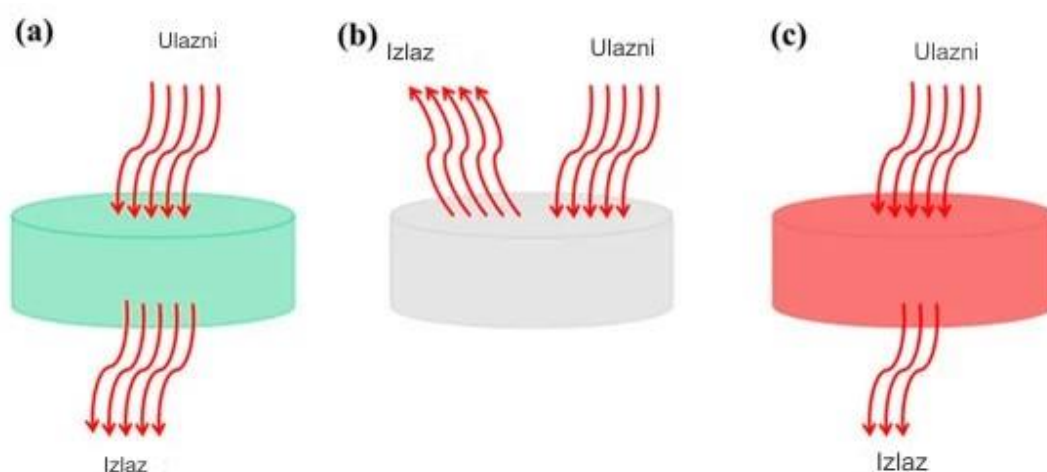
1.7 Mikrovalna ekstrakcija

1.7.1 Mehanizam djelovanja mikrovalova

Mikrovalovi su neionizirajući elektromagnetski valovi s frekvencijama između 300 MHz i 300 GHz. U spektru elektromagnetskog zračenja, mikrovalovi se nalaze između X-zraka i infracrvenog zračenja. Mikrovalovi se često koriste zbog sposobnosti djelovanja na određene materijale, pri čemu pretvaraju svoju elektromagnetsku energiju u toplinsku energiju u samom materijalu. Tradicionalne metode grijanja temelje se na fenomenima kondukcije i konvekcije i trpe velike gubitke topline, dok je grijanje mikrovalovima selektivno i ciljano, pa su gubici topline minimalni. Mikrovalovi mogu izravno zagrijati otapalo ili čvrste komponente uzorka zbog svoje sposobnosti prodiranja u sam materijal i interakcije s polarnim komponentama uzorka (32).

Zagrijavajuće djelovanje mikrovalova ovisi o dielektričnim svojstvima otapala i uzorka, koja su uvjetovana temperaturom i frekvencijom mikrovalova te sastavu otapala i uzorka. Različiti kemijski spojevi apsorbiraju mikrovalnu energiju približno u omjeru njihovih dielektričnih konstanti. Što je veća vrijednost dielektrične konstante uzorka, veća je apsorpcija mikrovalne energije. Zagrijavanje otapala i uzorka uz pomoć mikrovalova

temelji se na ionskoj vodljivosti i dipolnoj rotaciji molekula. Ionska vodljivost je elektroforetsko kretanje iona pod utjecajem elektromagnetskog polja. Otopina iskazuje otpor takvom kretanju iona, čime se u otopini stvara trenje koje pospješuje zagrijavanje otopine (33). Primjenom elektromagnetskog polja dolazi i do usmjeravanja dipola, što također potiče zagrijavanje otopine tj. uzorka. Različiti spojevi različito reagiraju na djelovanje mikrovalova, nepolarne komponente reflektiraju mikrovalno zračenje, dok ih polarni spojevi apsorbiraju (Slika 6).



Slika 6. Djelovanje mikrovalova na različite vrste materijala (adaptirano prema: (34))

a) ne apsorbira, b) reflektira, c) apsorbira i zagrijava se

1.7.2 Mogućnosti primjene mikrovalova

Mikrovalovi danas imaju široku primjenu u analitičkoj kemiji te industriji: automobilske, tekstilne, industriji keramike, gume, u prehrambenoj i kemijskoj industriji te medicini. U prehrambenoj industriji mikrovalovi se često primjenjuju za temperiranje, odmrzavanje, vakuumsko sušenje, dehidriranje, kuhanje i blanširanje, pasterizaciju, sterilizaciju, ekstrakciju i dr. Najveći problem kod primjene mikrovalova u prehrambenoj industriji predstavljaju veliki troškovi opreme te gubitak energije prilikom prelaska u veće mjerilo (engl. *scale – up*). Stoga je korištenje mikrovalova u industrijskom mjerilu uglavnom opravdano samo u slučaju kada je razvijen proizvod ili način proizvodnje koji ima određene posebne značajke zbog kojih je primjena mikrovalova isplativa i opravdana (35). Primjerice, primjena mikrovalova u pasterizaciji i sterilizaciji omogućuje uspješnu

inaktivaciju patogenih mikroorganizama uz značajno smanjenje trajanja procesa i bez gubitka kvalitete proizvoda. Korištenje mikrovalova za kuhanje, blanširanje i pečenje doprinosi očuvanju nutritivne vrijednosti hrane. Kuhanje mikrovalovima uglavnom ne inducira Maillardovu reakciju u hrani, zbog kratkog vremena kuhanja i relativno niskih temperatura. Problem kod kuhanja i pečenja mikrovalovima može biti debljina i nepravilan oblik hrane, koja u takvim slučajevima može biti nejednako toplinski obrađena. Dehidriranje proizvoda mikrovalovima zahtijeva manje energije od konvencionalnih metoda. Danas se razvijaju metode koje kombiniraju konvencionalne metode i upotrebu mikrovalova kako bi se razvili procesi jednolikog zagrijavanja sa što manjim utroškom energije i vremena (36).

Područje primjene mikrovalova koje se danas intenzivno istražuje je mogućnost primjene u različitim ekstrakcijskim postupcima. Mikrovalna ekstrakcija je neinvazivna, relativno nova metoda ekstrakcije bioaktivnih komponenti, uglavnom iz biljnih materijala (37). Mikrovalna ekstrakcija uvelike ovisi o dielektričnim svojstvima otapala i uzorka, topljivosti uzorka u otapalu i temperaturi postupka. Za mikrovalnu ekstrakciju uglavnom se koriste voda i polarna otapala koja imaju višu dielektričnu konstantu (38). Kemijski spojevi apsorbiraju mikrovalnu energiju približno u omjeru njihovih dielektričnih konstanti tj. što je veća vrijednost dielektrične konstante veća je apsorpcija mikrovalne energije. Osim dielektrične konstante, bitan faktor prilikom odabira otapala je i faktor raspršenja, koji pokazuje učinkovitost pretvorbe elektromagnetske energije u toplinu (39). Voda ima veću dielektričnu konstantu od polarnih otapala poput etanola i metanola, ali ima niži faktor raspršenja. Zbog toga se za mikrovalnu ekstrakciju može koristiti smjesa nekog organskog otapala i vode, kako bi se dobilo otapalo više dielektrične konstante i značajnijeg faktora raspršenja. Osim otapala, važan parametar za mikrovalnu ekstrakciju je i temperatura. Viša temperatura ekstrakcije općenito pospješuje učinak ekstrakcije, međutim previsoka temperatura može negativno utjecati na termolabilne komponente u uzorku. Mikrovalna ekstrakcija može biti provedena u zatvorenom ili otvorenom sustavu. U zatvorenim sustavima ekstrakcija se odvija u zatvorenoj posudi s jednoličnim mikrovalnim zagrijavanjem pri čemu je poželjno da je sustav izveden tako da postoji mogućnost kontrole tlaka i temperature. Ovakav sustav može postići više temperature, a time i efikasniju ekstrakciju zahvaljujući stvaranju povećanog tlaka u posudi, čime dolazi do povećanja točke isparavanja otapala. Međutim, u takvim sustavima je uglavnom ograničena mogućnost tretiranja većeg broja uzoraka istovremeno. Otvoreni sustavi za mikrovalnu

ekstrakciju mogu biti pogodniji za termolabilne spojeve, kakvi su posebno bioaktivne komponente iz biljnih materijala (32). Na učinkovitost mikrovalne ekstrakcije utječu različiti čimbenici poput jačine mikrovalova, njihove frekvencije, vremena izlaganja mikrovalovima, udjela vlage, veličine čestica i sastava uzorka, vrste otapala, temperature, tlaka i sl. Različiti materijali se također različito ponašaju djelovanjem utjecaja mikrovalova: nepolarni materijali reflektiraju mikrovalove; staklo, porculan i keramika propuštaju mikrovalove dok ih hrana, ljudsko tkivo i polarni materijali apsorbiraju (40). Glavne prednosti mikrovalne ekstrakcije su smanjenje vremena ekstrakcije i smanjenje količine otapala potrebnog za ekstrakciju. Zbog smanjene količine potrebnog otapala za ekstrakciju mikrovalovima, ova metoda ekstrakcije se smatra „zelenom“ metodom. Korištenje mikrovalova za ekstrakciju određenih komponenti iz biljnog materijala može biti jako pogodno jer se ekstrakcija može provoditi pri nižim temperaturama. To je posebno značajno za sve termolabilne spojeve, kakvi su proteini. Prednosti mikrovalne ekstrakcije su također i brže zagrijavanje, niži gradijent temperature i veći prinosi ekstrakcije. Neki od nedostataka metode su nemogućnost uporabe otapala koja nemaju sposobnost interakcije s mikrovalovima, što ovisi i o dielektričnosti otapala (vrijedi pravilo kada je dipolnost veća, da je jača interakcija). Nedostatak je i potreba za hlađenjem posude za mikrovalnu ekstrakciju na sobnu temperaturu prije otvaranja, što produljuje trajanje postupka ove uglavnom brze ekstrakcijske tehnike.

1.8 Ultrazvučna ekstrakcija

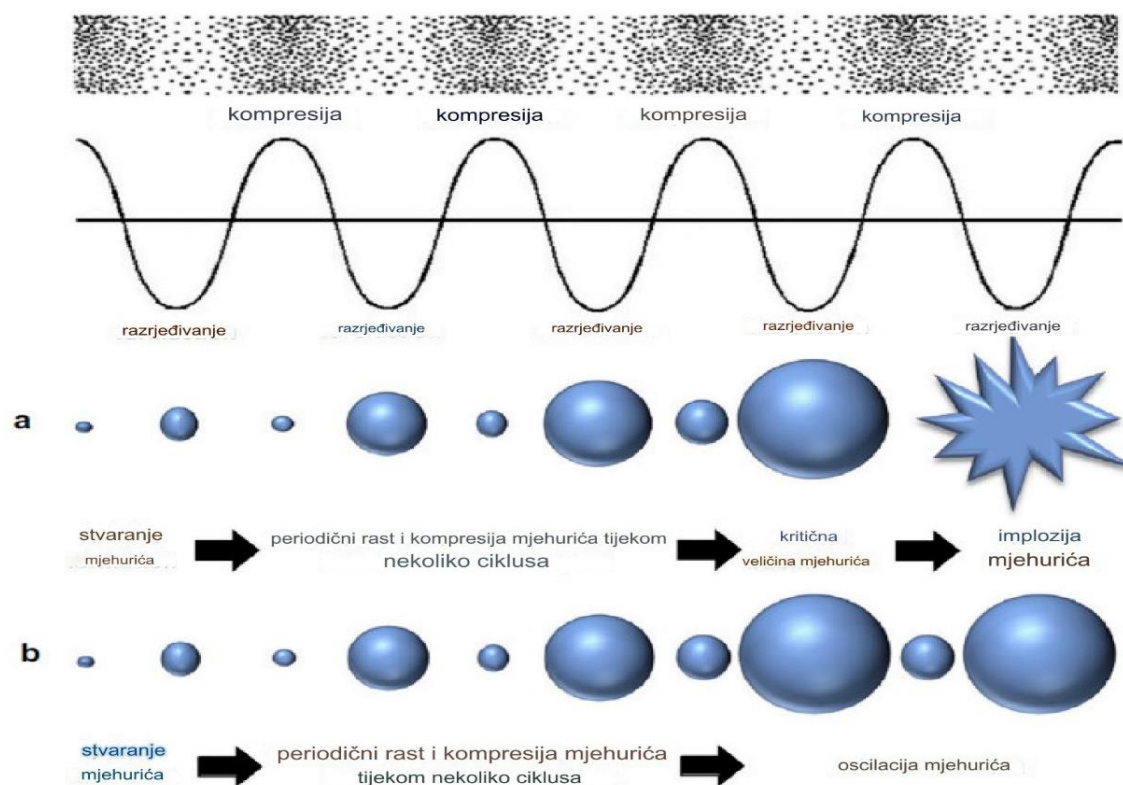
1.8.1 Mehanizam djelovanja ultrazvuka

Ultrazvuk se definira kao dio zvučnog spektra čija je frekvencija viša ili jednaka 20000 Hz te ju ljudsko uho ne može detektirati (41). Zvučni val karakterizira amplituda (A), frekvencija (f), valna duljina (l) i koeficijent prigušenja (α) koji ovisi o svojstvima materijala kroz koji ultrazvuk prolazi.

UAE u industriji je tehnika ekstrakcije koja koristi ultrazvučne valove za izdvajanje ili oslobađanje korisnih spojeva iz sirovih materijala. Ova tehnika koristi princip akustične kavitacije, što znači da se ultrazvučni valovi generiraju u tekućini ili smjesi, stvarajući male mjehuriće plina koji brzo rastu i kolabiraju pod pritiskom, stvarajući lokalne zone visokog tlaka i temperature. Ultrazvuk možemo podijeliti u dvije kategorije: niske i visoke snage,

a razlikuju se prema gustoći energije zvuka (W cm^{-3}), snazi (W) i intenzitetu zvučnih valova (W m^{-2}) (42). Ultrazvuk niske energije i niskog intenziteta (nižeg od 1 W cm^{-2}), ali visoke frekvencije (1-10 MHz) koristi se u dijagnostici, najviše zbog toga jer ne uzrokuje fizikalna i kemijska oštećenja materijala kroz kojeg prolaze (43). Međutim, ultrazvuk visoke energije i visokog intenziteta (višeg od 1 W cm^{-2}), ali niske frekvencije (20-100 kHz) uzrokuje fizička, mehanička, kemijska i biokemijska oštećenja materija kroz koji prolazi.

Ultrazvuk visoke snage nastaje tako da ultrazvučni pretvarač pretvara električnu ili mehaničku energiju u energiju zvuka. Prolaskom ultrazvučnog vala kroz medij nastaju longitudinalni valovi i dolazi do stvaranja područja promjenjivih kompresija i ekspanzija mjehurića. Nastaju milijuni mikroskopskih mjehurića koji se proširuju pod utjecajem negativnog tlaka, a zatim naglo implodiraju pod utjecajem pozitivnog tlaka, a ta se pojava naziva kavitacija. Nastali mjehurići su ispunjeni plinom ili parom i kada se podvrgnu nepravilnim oscilacijama dolazi do prsnuća. Pritom dolazi do stvaranja regija vrlo visoke temperature (5500 K) i tlakova (100 MPa) (Slika 7) što dovodi do promjena fizikalno-kemijskih svojstava lokalnih molekula (44, 45).



Slika 7. Usporedba ciklusa kompresije i ekspanzije s formiranjem, rastom i implozijom kavitacijskog mjehurića (adaptirano prema (45))

Najvažniji čimbenik koji dovodi do pojave kavitacije je frekvencija. Prilikom optimizacije primjene ultrazvuka potrebno je uzeti u obzir intenzitet ultrazvuka, temperaturu, vremenski interval i druge parametre (46). Svojstva proizvoda kao što su viskoznost medija, gustoća, površinska napetost, prisutnost otopljenih plinova i slično utječu na pojavu kavitacije, dok je temperatura obrnuto proporcionalna tome. Stoga, svaka tekućina ima karakterističnu temperaturu pri kojoj kavitacija ima najveću aktivnost (47). Kavitacija uzrokuje depolimerizaciju čime se oslobađaju manje molekule ili fragmenti polimera. Istraživanja su pokazala kako primjenom ultrazvuka dolazi do smanjenja viskoznosti bez promjene u kemijskoj strukturi polimernih lanaca. Novija istraživanja su pokazala da ultrazvuk visokog intenziteta utječe na strukturu i funkcionalna svojstva različitih polisaharida (48). No, primjena ultrazvuka visokog intenziteta može imati negativne posljedice odnosno stvarati slobodne radikale.

Pod pojmom ekstrakcija podrazumijevamo tehnološku operaciju potpunog ili djelomičnog odjeljivanja tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima. Tijekom ekstrakcije dolazi do prijenosa mase tvari - otopljene tvari prelaze iz namirnice u otapalo i ona se

odvija u tri koraka: željena komponenta se otapa u otapalu, smjesa otapala i otopljene tvari prelazi iz namirnice na površinu, otopljena tvar je raspršena u otapalu (49). UAE djeluje na principu kavitacije. Implozija kavitacijskog mjehurića uzrokuje oštećenja matrice materijala na granici čvrste i tekuće faze te dolazi do erozija materijala. Prilikom implozije stvaraju se mikro-mlazovi koji uz visok tlak i temperaturu uništavaju staničnu stijenku. Kavitacija uzrokuje bubrenje stanica i probijanje staničnih stijenki, čime se omogućava brža difuzija i ispiranje komponenti iz stanice. Rezultat toga je brža i učinkovitija ekstrakcija. Cilj primjene UAE je povećati prinos željenih komponenti, a smanjiti vrijeme ekstrakcije, reducirati korištenje otapala, reducirati nastanak slobodnih radikala, a da se pritom očuvaju prirodna svojstva materijala. Pojednostavljena je manipulacija i obrada, krajnji produkt je znatno veće čistoće te ne zahtijeva naknadnu obradu otpadnih voda jer su korištena „zelena otapala“. UAE troši samo dio fosilne energije koja se inače koristi u konvencionalnim metodama ekstrakcije poput Soxhletha, maceracije, centrifugiranja ili destilacije vodenom parom (50).

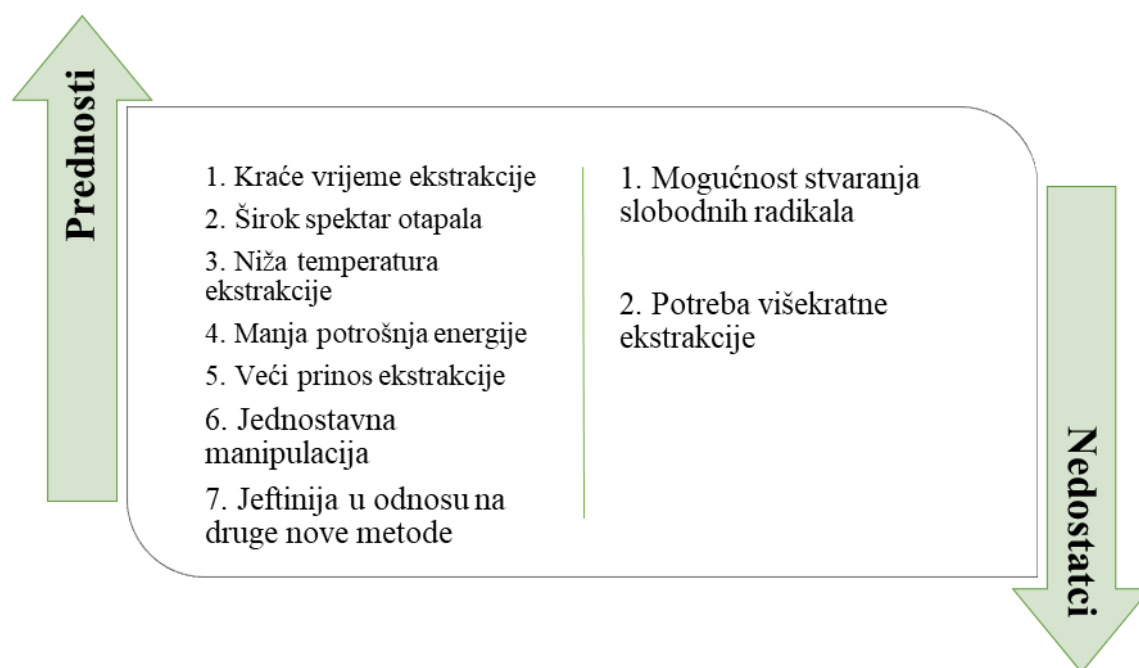
1.8.2 Uređaji i otapala u ultrazvučnim ekstrakcijama

Ultrazvučni uređaji dolaze u obliku dvije izvedbe: ultrazvučne kupelji i ultrazvučne sonde. Ultrazvučna kupelj generira ultrazvuk pomoću niza ultrazvučnih pretvarača koji se mogu nalaziti ispod dna spremnika ili sa strane spremnika ili u obliku kutija s pojedinačnim pretvaračima. Pretvarači u ultrazvučnoj kupelji imaju veliku površinu i mogu se pričvrstiti na dno ili stranice spremnika čime bi se dodatno povećala površina koja će vibriranjem generirati zvučni val u medij spremnika. Tako nastala zvučna energija je niskog intenziteta. Za razliku od kupelji, ultrazvučna sonda se uranja u otapalo i vrši direktnu distribuciju ultrazvuka u mediju pri čemu su gubici energije svedeni na minimum. S obzirom da su ultrazvučne sonde znatno manje površine, one generiraju valove većeg intenziteta. Prilikom odabira uređaja treba uzeti u obzir vrstu sonde i dizajn reaktora koji mogu utjecati na uspješnost ekstrakcije (51). Osim navedenog, na uspješnost ekstrakcije utječu temperatura, vrijeme trajanja tretmana, veličina čestica i slično.

U industriji se UAE već primjenjuje za izolaciju polifenola, antocijana, aromatskih tvari, polisaharida, pigmenata, ulja i funkcionalnih spojeva. Kako bi se dodatno povećala njezina primjena potrebno je jamčiti sigurnost, održivost, isplativost i ekološku prihvatljivost primjene (48). Prednost ove metode je što može koristiti vodene otopine i druga „zelena

otapala“ koja su sigurnija i ekološki prihvatljivija od organskih otapala. Najčešća „zelena otapala“ su: voda, terpeni (npr. limonen, pinen i sl.), biljna ulja, agrootapala, superkritični fluidi, ionske kapljevine, prirodna eutektička otapala i slično. UAE se pokazala izvrsnom i kada se radi o skupim sirovinama jer je ekonomičnija; postiže veće prinose u kraćem vremenu ekstrakcije (52).

Prednosti i nedostaci primjene UAE prikazane su na Slici 8.



Slika 8. Usporedba prednosti i nedostataka UAE

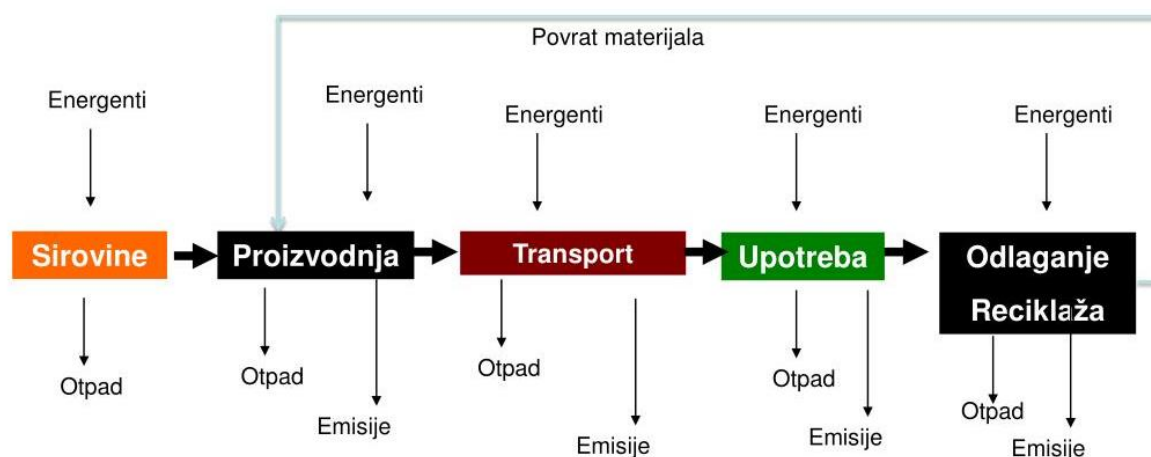
UAE se uspješno primjenjuje za izolaciju različitih bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala. Istraživanja su pokazala kako se primjenom ove vrste ekstrakcije znatno smanjilo vrijeme ekstrakcije, količina korištenog otapala i potrošena energija za provedbu ekstrakcije, dok se prinos ekstrakcije znatno povećao u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju (53).

Zbog širokog spektra primjene, ultrazvuk je sve prisutniji u prehrambenoj industriji. Stoga se ultrazvuk visokog intenziteta (20-100 kHz) koristi za čišćenje, otplinjavanje tekućina kao što su gazirana pića prije punjenja u boce, homogenizaciju tekućina, sušenje, omekšavanje mesa jer dolazi do prekida integriteta mišićnih stanica, ekstrakciju, emulgiranje, destilaciju, kristalizaciju, sterilizaciju, pasterizaciju, filtriranje jer dolazi do povećanja protoka, protiv pjenjenja jer valovi trenutačno razbijaju mjehuriće, rezanje lomljivih namirnica, zamrzavanje, odmrzavanje, ekstruziju, depolimerizaciju (50). S

obzirom da je ultrazvuk niskog intenziteta manje razoran koristi se kao analitička metoda za kontrolu obrade hrane, mjerenje teksture, sastava, viskoznosti, brzina protjecanja, kontrolu pakiranja, određivanje razine kapljevine u bačvama ili tankovima, koncentracija tvari u hrani (47).

1.9 Životni ciklus proizvoda

Životni ciklus određenog proizvoda je izraz koji uključuje dobivanje sirovine za proizvod, proizvodni proces, distribuciju, primjenu proizvoda, odlaganje proizvoda nakon primjene (otpad) i transport proizvoda između pojedinih faza ciklusa (54). Analiza životnog ciklusa (LCA) je metodologija za procjenu utjecaja proizvoda na okolinu uzimajući u obzir njegov cjeloviti životni ciklus, od dobivanja sirovina do odlaganja. LCA je dio ISO 14000 standarda za prihvatljivo gospodarenje okolišem (55). LCA se primjenjuje u industrijskom sektoru kako bi se identificirala područja u kojima su mogući napreci u smislu smanjenja utjecaja na okoliš. Alternativno, LCA može biti korisna za dobivanje podataka o utjecaju određenog područja, regije ili države na okoliš. Mnoge tvrtke provode LCA kako bi dokazali ekološku prihvatljivost svojih proizvoda. LCA analiza se koristi i u razvoju novih procesa ili proizvoda, za edukaciju i za deklariranje proizvoda. LCA također ima veliku ulogu u zbrinjavanju otpada i zagađenja okoliša. Prema standardu ISO 14000, LCA se sastoji od četiri glavne faze: određivanje ciljeva i područja rada, detaljne analize odabranog sustava, procjena utjecaja na okolinu i interpretacija rezultata (Slika 9).



Slika 9. Općeniti primjer faza provedbe LCA

1.9.1 Analiza životnih ciklusa

U prvoj fazi analize se određuje svrha i opseg analize (engl. „*goal and scope definition*“). Ta faza podrazumijeva odabir područja rada (npr. definiranje procesa ili proizvoda), odabir vrste LCA koja će se koristiti i odabir funkcionalne jedinice koja omogućava usporedbu različitih procesa i proizvoda. LCA se dijeli na podvrste s obzirom na to koliko se detaljno prati proizvodni proces od sirovine (početka procesa) do finalnog proizvoda (aktivnosti). U ovoj fazi se također opisuju metode koje će se koristiti za procjenu potencijalnog utjecaja na okolinu te se definiraju kategorije promatranih utjecaja (56).

U drugoj fazi analize prikupljaju se podaci i modeliraju se sustavi dobivanja određenog proizvoda (engl. „*life cycle inventory analysis*“). Podaci uključuju sve informacije koje se odnose na različite kategorije utjecaja na okolinu za svaku pojedinu fazu procesa proizvodnje. Podaci prikupljeni u ovoj fazi moraju se odnositi na funkcionalnu jedinicu proizvoda definiranu u prvoj fazi LCA (57).

U trećoj fazi analize se određuje utjecaj na okoliš (engl. "*life cycle impact assessment*") Sastoji se od vrednovanja potencijalnih utjecaja sustava na okoliš i ljudsko zdravlje. Definiraju se metodologija za procjenu utjecaja te kategorije utjecaja na okolinu koje će se analizirati (npr. potencijal globalnog zatopljenja, eutrofikacija, opasnost oboljenja od raka itd.), a zatim se provodi normalizacija i procjena (vaganje) pojedinog utjecaja prema ISO standardima.

Zadnja faza analize je faza interpretacije (engl. "*life cycle interpretation*") u kojoj se koriste sistematske tehnike kako bi se identificirali, kvantificirali, provjerili i potvrdili rezultati dobiveni iz faze popisivanja i analize podataka i/ili faze određivanja utjecaja na okoliš. Svrha ove faze je utvrditi razinu pouzdanosti konačnih rezultata, raspraviti dosljednost pretpostavki u odnosu na svrhu i opseg analize (54).

Alati koji se koriste za izradu LCA analize su računalni programi koji su povezani s bazama podataka u kojima se nalaze informacije o različitim proizvodima i proizvodnim procesima koji su sastavni dio svake LCA analize, a svrha im je što brža i jednostavnija provedba analize. U bazama podataka se nalaze podaci o sirovinama, proizvodnji električne energije, transportni procesi, procesi obrade nusproizvoda, otpada i slično. Vodeći računalni programi kao što su SimaPro uključuju velik broj baza podataka iz različitih izvora te procjenjuju utjecaj na okoliš unutar nekoliko kategorija. Računalni program SPionExcel koja se bazira na SPI metodi omogućuje laganu usporedbu različitih industrijskih procesa

te se često koristi za identifikaciju koraka u procesima koji imaju veliki ekološki utjecaj na okoliš (58).

1.9.2 Indeks održivosti procesa

Indeks održivosti procesa (SPI) je još jedan od načina za kvalitativno i kvantitativno izražavanje utjecaja na okoliš određenog proizvoda ili procesa proizvodnje. SPI ima fokus na samu održivost procesa s ekološkog i ekonomskog stajališta te je usmjeren na pronalaženje tehnoloških rješenja u svrhu poboljšanja održivosti procesa. Balance energije koje se formiraju moraju biti održive s obzirom na količinu energije koja se utroši unutar neke granice sustava te se utrošena energija mora i obnoviti nekim vanjskim izvorom. U izračunu SPI pretpostavlja se da je taj vanjski izvor energije solarna radijacija (sunčeva svjetlost). Dostupnost energije sunca ovisi o količini koja se može apsorbirati tj. o dostupnoj površini (m^2). Stoga sve djelatnosti ovise o iskorištavanju dostupne površine te o limitaciji dostupne energije potrebne za razmjenu masenih i energetske tokova. Indeks održivosti procesa (SPI) predstavlja izračunatu prirodnu površinu potrebnu da se obnovi utrošena masa i energija potrebna za određeni proces, te da se stvori određena masa ili energija održivim procesima (59).

1.10 Kružno gospodarstvo

Globalno gospodarstvo može se okarakterizirati kao "linearno" jer se uglavnom temelji na ekstrakciji, proizvodnji, korištenju i odlaganju. Tako postavljena linearna ekonomija dovodi do iscrpljivanja resursa, gubitka bioraznolikosti, otpada i zagađenja i pri tome prouzrokuje veliki nedostatak sposobnosti našeg planeta da nastavi zadovoljavati potrebe budućih generacija. Štoviše, nekoliko je planetarnih granica već dosegnuto ili premašeno. Kako bismo zadovoljili naše trenutačne i buduće potrebe (dobrobit, stanovanje, prehrana, zdravstvena skrb, mobilnost itd.), potiče se tranzicija prema gospodarstvu koje je više kružno, i u kojem se prirodnim resursima upravlja i obnavlja na održiv način, dok se pri tome osigurava kvaliteta i otpornost ekosustava. Organizacije prepoznaju mnoge razloge za uključivanje u kružno gospodarstvo, npr. pružanje konkurentnijih i održivijih rješenja; poboljšani odnosi s dionicima; sve učinkovitiji načini ispunjavanja dobrovoljnih obveza ili pravnih zahtjeva; uključivanje u ublažavanje ili prilagodbu klimatskim promjenama; upravljanje rizicima nestašice resursa, povećanje otpornosti u ekološkim, društvenim i ekonomskim sustavima itd. Kružno gospodarstvo je model proizvodnje i potrošnje koji

obuhvaća posudbu, ponovno korištenje, dijeljenje, popravljjanje, obnavljanje i recikliranje postojećih proizvoda i materijala kako bi se povećalo njihovu vrijednost izraženu u vremenu. Europska unija zahtijeva uvođenje takvog modela proizvodnje umjesto linearnog modela, gdje su proizvodi odbačeni nakon njihovog korištenja. Prevladavajući gospodarski model u svijetu je linearni model koji maksimalizira profit, svjesno skraćujući vijek proizvoda kako bi potrošači bili prisiljeni kupovati novi proizvod. Korištenjem cirkularnog ekonomskog modela produljuje se životni vijek proizvoda, što bitno doprinosi smanjenju negativnih učinaka na okoliš. Na Slici 10 je prikazan osnovni koncept kružnog gospodarstva od sirovine preko proizvoda (proizvodnje), plasiranja na tržište, uporabe, odlaganja i ponovne upotrebe.



Slika 10. Osnovni koncept kružnog gospodarstva (vlastita ilustracija)

1.10.1 ISO standardi niza ISO 59000

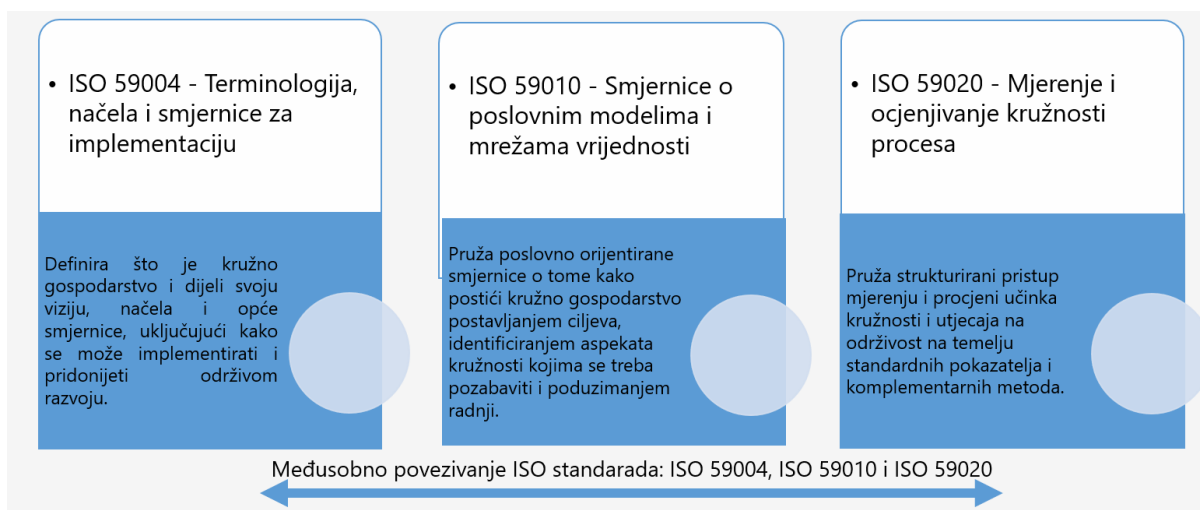
Za razumijevanje kružnog gospodarstva te za podršku njegovoj provedbi i mjerenju osmišljena je serija dokumenata standarda ISO 59000:2024 (60) (Tablica 1). Njihov cilj je standardizacija u području kružne ekonomije – definiranje pravnih okvira, zahtjeva, smjernica i alata podrške za provedbu aktivnosti vezanih uz uvođenje koncepta kružnog gospodarstva i usklađivanje s ciljevima održivog razvoja. Jedan od važnih motivirajućih čimbenika za ISO standardizaciju bio je pokušaj postizanja konsenzusa transparentnosti i

smanjenja rizika od npr. *greenwashing*-a.

Tablica 1. ISO standardi serije 59000

ISO 59004:2024 - Kružno gospodarstvo – terminologija, načela i smjernice za provedbu	
ISO 59010:2024	Kružna ekonomija – Smjernice o poslovnim modelima i mrežama vrijednosti
ISO 59020:2024	Cirkularna ekonomija – Mjerenje i procjena kružnosti
ISO 59040:2024	Cirkularna ekonomija – Standard s podacima o kružnosti proizvoda
ISO 59014:2024	Upravljanje okolišem i kružno gospodarstvo – Načela, zahtjevi održivosti i sljedivosti oporabe sekundarnih materijala
ISO TR 59031	Cirkularna ekonomija – pristupi temeljeni na učinku
ISO TR 59032	Cirkularna ekonomija – Pregled implementacije poslovnog modela

U ovoj seriji standarada, ISO 59004, ISO 59010 i ISO 59020 međusobno su povezani kao što je prikazano na Slici 11 i podržavaju organizacije u provedbi tranzicije u kružnom gospodarstvu.



Slika 11. Veza između ISO standarda niza ISO 59004, ISO 59010 i ISO 59020 (adaptirano prema (61))

1.10.2 Agenda 2030

Navedena ISO serija 59000 također podržava organizacije, poput vlade, industrije i neprofitnih organizacija u doprinosu ostvarenju UN-ove agende 2030 za održivi razvoj (10). Program Ujedinjenih naroda o održivom razvoju do 2030. godine, poznat kao Agenda 2030, usvojen je na Summitu Ujedinjenih naroda o održivom razvoju u New Yorku u rujnu 2015. godine. Završni dokument Summita, formalno usvojen kao rezolucija Opće skupštine UN-a 70/1 dana 21. listopada 2015., nosi naslov "Promijenimo naš svijet: Agenda 2030 za održivi razvoj". Osim toga, Agenda 2030 uključuje i UN-ov „Okvir iz Sendaija“ za smanjenje rizika od katastrofa za razdoblje 2015.-2030., Akcijski plan Treće Konferencije Ujedinjenih naroda o financiranju razvoja iz srpnja 2015. te Pariški sporazum o klimatskim promjenama iz travnja 2016. godine. Središte razvojne agende čini 17 ciljeva održivog razvoja (engl. *Sustainable Development Goals – SDGs*) koji su detaljno razrađeni u 169 međusobno povezanih pod-ciljeva. Ovi ciljevi predstavljaju ključnu platformu za suočavanje s najvažnijim izazovima suvremenog društva u područjima gospodarstva, socijalnih pitanja, okoliša te političke i sigurnosne stabilnosti. Agenda 2030 je od iznimne važnosti za međunarodnu zajednicu zbog svoje sveobuhvatnosti, inkluzivnosti, univerzalnosti i transformativnog karaktera. Naglasak je stavljen na ljude, planet, prosperitet, mir i partnerstvo, očekujući od država da se u skladu sa svojim nacionalnim kapacitetima angažiraju kako bi se osiguralo da "nitko ne bude ostavljen po strani" (62).

Iako sama Agenda 2030 nije pravno obvezujući dokument, osim veze s Pariškim

sporazumom o klimatskim promjenama, sve države članice UN-a preuzele su političku obvezu njene provedbe. Implementacija Agende 2030 jača načela dobre uprave, vladavine prava te smanjuje rizike od sukoba i drugih prijetnji miru i sigurnosti. Agenda 2030 potiče države da razviju praktična i ambiciozna nacionalna rješenja za njenu provedbu te podržava uspostavu redovitih i inkluzivnih procesa pregleda implementacije na nacionalnoj i lokalnoj razini. Posebna pozornost posvećuje se uključivanju svih dionika održivog razvoja, uključujući državne i lokalne institucije, organizacije civilnog društva, akademsku zajednicu i privatni sektor, uz podršku parlamenta i drugih relevantnih institucija (63).

1.10.3 Ukupni ekološki otisak proizvoda

Ukupni ekološki otisak proizvoda je kompleksan koncept koji obuhvaća različite ekološke utjecaje proizvoda tijekom cijelog njegovog životnog ciklusa, uključujući proizvodnju, distribuciju, uporabu i odlaganje. To uključuje potrošnju resursa poput energije, vode i sirovina, emisije stakleničkih plinova, onečišćenje zraka, tla i vode, kao i utjecaj na bioraznolikost (64). Ukupni ekološki otisak može se mjeriti različitim metodama, a jedan od često korištenih alata za to je, kao što je prethodno pojašnjeno, i LCA. Kada se radi o izračunavanju ukupnog ekološkog otiska proizvoda, važno je uzeti u obzir sve relevantne faktore, uključujući proizvodnju, distribuciju, uporabu i odlaganje. Utjecaj na okoliš proizvodnje uključuje potrošnju energije, emisije stakleničkih plinova, potrošnju vode, uporabu kemijskih supstanci i druge faktore povezane s proizvodnim procesom. Transport proizvoda može pridonijeti emisijama stakleničkih plinova i potrošnji goriva. Uzimaju se u obzir i pakiranje i ambalaža te njihov utjecaj na okoliš. Potrošnja energije i vode tijekom uporabe proizvoda, kao i eventualna emisija štetnih tvari tijekom korištenja, mogu biti značajan dio ukupnog ekološkog otiska. Kako se proizvod zbrinjava na kraju svog životnog ciklusa može imati značajan utjecaj na okoliš. To uključuje recikliranje, kompostiranje, spaljivanje ili odlaganje na odlagalište.

Ukupni ekološki otisak proizvoda može biti složen za izračunavanje i varira ovisno o vrsti proizvoda, sirovinama, proizvodnom procesu, uporabi i drugim faktorima. Ipak, analiza životnog ciklusa i srodne metode mogu pružiti korisne informacije o ekološkom otisku proizvoda kako bi se identificirali ključni izvori utjecaja i razvile strategije za smanjenje negativnih utjecaja na okoliš. Za razliku od ekološkog otiska, terminom ugljični otisak (engl. *carbon footprint*) opisuju se ukupne emisije stakleničkih plinova (uključujući

ugljikov dioksid) koje, izravnim ili neizravnim radnjama, proizvodi pojedinac ili skupina ljudi (65). Staklenički plinovi ispuštaju se prilikom proizvodnje i potrošnje roba i usluga. Ekološki otisak ugljikovog dioksida iznimno je velik i predstavlja jednu od većih opasnosti za Zemlju. Ugljični otisak čini većinu, odnosno 60 % globalnog ekološkog otiska, prema podacima Global Footprint Network-a (64). Ono što razlikuje ekološki i ugljični otisak jest da se ekološkim otiskom mjeri čovjekov utjecaj na Zemljine ekološke kapacitete, dok se ugljičnim otiskom mjeri samo jedan (ali vrlo važan) aspekt ukupnog ekološkog otiska - utjecaj na emisije stakleničkih plinova. Dakle, ekološki otisak uključuje ekološke utjecaje, među kojima su i emisije stakleničkih plinova te upotreba ekoloških resursa.

1.10.4. Europski zeleni plan

2007. su čelnici Europske unije (EU) odredili cilj smanjenja emisija stakleničkih plinova za 20 % do 2020. godine, a u usporedbi s razinom iz 1990. godine. 2014. godine podržali su cilj smanjenja emisija stakleničkih plinova za najmanje 40 % do 2030. godine. S obzirom na rastuću klimatsku krizu i potrebu za jasnim zakonodavnim smjernicama, Europski parlament je u studenom 2019. proglasio izvanredno klimatsko stanje i tražio od Europske komisije (EK) da prilagodi svoje prijedloge kako bi se globalno zagrijavanje ograničilo na 1,5 °C te osiguralo značajno smanjenje emisija stakleničkih plinova.

Europski zeleni plan (engl. *The European Green Deal*) predstavljen je od strane EK 2019. godine s ciljem postizanja klimatske neutralnosti EU do 2050. godine. Ovim planom potvrđena je predanost EU suočavanju s klimatskim pitanjima i izazovima modernog društva uzrokovanih klimatskim promjenama. Cilj je osigurati prosperitetniju, pravedniju i sigurniju budućnost za naredne generacije, unutar EU i šire. Smjernice prema kojima će se provoditi "zeleni tranzicija" obraćaju pozornost na regije, industrije i radnike koji će se suočiti s najvećim izazovima (66). Europski zeleni plan uključuje reviziju postojećih politika EU usmjerenih na opskrbu čistom energijom, promet, industriju, građevinarstvo, poljoprivredu, oporezivanje, socijalne naknade itd. Posebna se pažnja posvećuje podizanju svijesti o zaštiti okoliša, zaštiti ljudskog zdravlja i održivoj uporabi resursa. Ključni element Europskog zelenog plana je uspostava pravnog okvira o dopuštenim emisijama stakleničkih plinova u sklopu Europskog zakona o klimi.

EU je zakonski Uredbom (EU) 2021/1119 EP obvezala na smanjenje emisija stakleničkih plinova kako bi postigla klimatsku neutralnost (ugljična neutralnost) do 2050. godine (67),

odnosno ravnotežu između količine emitiranog ugljikovog dioksida i njegove apsorpcije iz atmosfere u tzv. ponore ugljika. Međutim, globalne godišnje emisije CO₂ već su dostigle 37,8 Gt u 2021. godini te je potrebno smanjiti emisije obzirom da ne postoje učinkoviti umjetni ponori ugljika. Zakonom o klimi osnovan je Europski znanstveni savjetodavni odbor za klimatske promjene, sastavljen od neovisnih stručnjaka iz različitih država članica. Funkcija ovog savjetodavnog odbora uključuje razmatranje najnovijih znanstvenih spoznaja i klimatskih podataka relevantnih za EU (68). Jedna od mjera paketa „Spremni za 55“ je revizija Europskog sustava za trgovanje emisijama (engl. *EU Emissions Trading System, EU ETS*). EU ETS je tržišni sustav ugljikovog dioksida pokrenut 2005. godine kojim se određuje ukupna količina stakleničkih plinova koju neki od sudionika sustava smije ispustiti. Bazira se na principu „zagađivač plaća“ i obvezuje više od 10.000 elektrana i tvornica na posjedovanje dozvola za svaku tonu emitiranog CO₂. Tvrtke su ih dužne kupiti na aukcijama, a cijena ovisi o ponudi i potražnji. U suštini, radi se o financijskom poticaju za smanjenje zagađenja, koji se pokazao kao efikasan alat za redukciju emisija stakleničkih plinova. Novoinstalirani sustavi pokriveni u okviru EU ETS smanjili su emisije za 35 % od 2005. do 2021. godine (69).

Prehrambena industrija i zbrinjavanje otpada hrane mogu biti obuhvaćeni odredbama Direktive (EU) 2023/2413 ako se ti sektori ne nalaze unutar sustava trgovanja emisijama EU (EU ETS) i imaju značajan utjecaj na emisije stakleničkih plinova. Direktiva ima za cilj promicanje održive uporabe energije i smanjenje emisija stakleničkih plinova u različitim sektorima koji nisu obuhvaćeni EU ETS-om. Stoga, ako prehrambena industrija i zbrinjavanje otpada hrane doprinose emisijama stakleničkih plinova, mogu biti obuhvaćeni mjerama predviđenima u ovoj direktivi radi postizanja ciljeva održivosti i smanjenja emisija u tim sektorima (70).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Istraživanje zelenih metoda ekstrakcije kod biološki važnih spojeva iz SPK predstavlja značajan korak prema održivosti i razvoju zelene ekonomije. Ovim pristupom ne samo da se smanjuje potrošnja otapala i energije, već se omogućuje i učinkovito iskorištavanje nusproizvoda kave koji se inače smatraju otpadom. S obzirom na to da SPK sadrži visok udio proteina, razvoj učinkovitog procesa ekstrakcije može doprinijeti razvoju alternativnih izvora proteina, što je ključno u kontekstu globalne potražnje za održivim prehrambenim resursima.

Uz brojne čimbenike koji ograničavaju šire korištenje SPK (a i drugog otpada prehrambene industrije), kao što su dostupnost i zdravstvena ispravnost sirovine, posebno je problematičan nedostatak jednostavnih i visokoučinkovitih postupaka koji će omogućiti održivu i isplativu ekstrakciju biološki vrijednih sastavnica. Na kemijski sastav SPK značajno utječu sortiment, porijeklo sirovine, način prerade kave i skladištenje. Kemijski sastav SPK dostupne u Hrvatskoj kao ni njezina zdravstvena ispravnost, kao osnovni preduvjet korištenja, do danas nisu istraženi.

Osnovne hipoteze predloženog istraživanja su da je SPK s obzirom na svoj kemijski sastav zdravstveno ispravna te tako prihvatljiva sekundarna sirovina za primjenu u prehrambenoj industriji i da je primjenom UAE ili MAE uz vodu kao ekstrakcijsko sredstvo moguće dobiti proteinske ekstrakte s potencijalom primjene u prehrambenoj industriji, uz prihvatljive učinke na okoliš.

Iz navedene hipoteze proizlaze i glavni ciljevi istraživanja - utvrditi zdravstvenu ispravnost SPK, optimizirati proces ekstrakcije proteina iz SPK primjenom UAE i MAE, izraditi procjenu utjecaja razvijenih ekstrakcijskih postupaka na okoliš pomoću LCA metode te utvrditi karakteristike proteina i količinu polifenola u dobivenim ekstraktima kako bi se utvrdio potencijal primjene u prehrambenoj industriji.

UAE i MAE odabrane su kao ciljane tehnike kod ovog istraživanja zbog njihove visoke razine tehnološke spremnosti, odnosno relativno jednostavnog *scale-upa*, iako su već primjenjivane u ekstrakciji bioaktivnih spojeva iz SPK. Originalnost predloženog istraživanja očituje se u činjenici da se prvi puta istražio utjecaj primijenjenih uvjeta UAE i MAE, ne samo na prinos, već i na kvalitetu proteinskih ekstrakata, i to u smislu aminokiselinskog sastava te strukturalnih karakteristika proteina s posebnim naglaskom na mogućnost dobivanja bioaktivnih peptida. Također, po prvi puta se primjenom LCA analizirao životni ciklus proteinskih ekstrakata dobivenih različitim ekstrakcijskim postupcima što u ovom kontekstu omogućava objektivnu procjenu ekološke prihvatljivosti

ekstrakcijskih procesa. Oba čimbenika (kvaliteta dobivenih ekstrakata i ekološka prihvatljivost) razmatrala su se, uz prinos proteina, u odabiru optimalnog ekstrakcijskog postupka.

Procjenom životnog ciklusa optimiziranih ekstrakcijskih postupaka na laboratorijskoj razini, procijenilo se i opterećenje okoliša koje nastaje kao posljedica provedbe istih na industrijskoj razini što predstavlja značajan širi doprinos u području primjene životnog ciklusa proizvoda (LCA) u procjeni održivih tehnologija ekstrakcije.

Zaključno, rezultati ovog rada doprinose većim mogućnostima iskorištavanja SPK kroz razvoj ekološki prihvatljivih i tehnološki optimiziranih ekstrakcijskih postupaka. Pri tome naglašava važnost parametara kvalitete i održivosti, uključujući ekološki otisak, u modernim tehnikama procesiranja, čime se omogućuje poboljšanje kvalitete konačnih proizvoda uz istovremenu minimalizaciju negativnih učinaka na okoliš.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Uzorci

Uzorci SPK su za provedbu istraživanja dobiveni od tvrtke Franck d. d., proizvođača kave, čaja i snack proizvoda (Zagreb, Hrvatska).

Kako bi se osigurala reprezentativnost, uzorci su prikupljeni nasumično, u 6 točaka (u vremenskom rasponu od 60 dana iz 6 različitih šarži kave). Sve šarže sadržavale su mješavinu dviju vrsta kave: *C. arabica* i *C. robusta*. Prilikom svakog uzorkovanja iz pogona redovne proizvodnje je izuzeto po 5 komada briketa SPK koji su transportirani u laboratorij i usitnjeni u prah pomoću kuhinjskog štapnog miksera. Nakon provedbe 6 različitih uzorkovanja, gdje je prikupljeno i usitnjeno sveukupno 30 briketa SPK, svi mljeveni uzorci su homogenizirani te je navedena smjesa korištena za provedbu daljnjih istraživanja.

3.1.2 Kemikalije i standardi

Kemikalije:

1. AccQ•Fluor Ultra Eluent A Concentrate (Waters, Milford, SAD)
2. Aceton (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
3. Acetonitril (ACN) (VWR Chemicals, Radnor, SAD)
4. Amonij formijat (Gram-Mol, Zagreb Hrvatska)
5. Amonijev bikarbonat (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
6. Argon, 99,9995 % (Messer, Bad Soden am Taunus, Njemačka)
7. Destilirana voda (PBF, Zagreb, Hrvatska)
8. Dušična kiselina (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
9. Fenol (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
10. Galna kiselina (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
11. Helij, 6.0 (Messer, Bad Soden am Taunus, Njemačka)
12. Klorovodična kiselina (VWR Chemicals, Radnor, SAD)
13. Metanol (GramMol, Zagreb, Hrvatska i Honeywell, Wabash, SAD)
14. Mješavina soli magnezij-sulfata, natrij-klorida i citratnih soli (Citate-Kit-01, BEKOlut, Bruchmühlbach-Miesau, Njemačka)

15. Mješavina soli magnezij-sulfata, primarno sekundarnog amina i GCB-a (PSA-Kit-06, BEKOlut, Bruchmühlbach-Miesau, Njemačka)
16. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Burlington, SAD)
17. Natrijev deoksikolat (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
18. Natrijev hidroksid (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
19. Peptidi za kalibriranje instrumenta ProteoMass MALDI calibration kit (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
20. Petrol-eter (Applichem, Chicago, SAD)
21. Sumporna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
22. Tetrahidrofuran (Merck, Burlington, SAD)
23. Trietilamonij bikarbonat (1M) (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
24. Trifluorooktenu kiselina (TFA) (Merck, Burlington, SAD)
25. Triklorooktenu kiselina (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
26. Tripsin (Promega, Madison, SAD)
27. Vodikov peroksid (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
28. Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)
29. α -cijano-4-hidroksi-cimetna kiselina (CHCA) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

Standardi:

1. Amino acid standard H (Waters, Milford, SAD)
2. Certificirani referentni materijal elementa (CPACChem, Bogomilovo, Bugarska)
3. Gel filtracijski standardi (BioRad, Hercules, SAD)
4. Mješavina standarda pesticida (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

3.1.3 Reagensi

1. AccQ•Fluor Reagent Kit (Waters, Milford, SAD)
2. Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
3. Zasićena otopina natrijeva karbonata
4. Reagens A: 2 % Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH
5. Reagens B: 0,5 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ u 1 % Kalij natrijevom tartaratu
6. Reagens C: 50 mL reagensa A i 1 mL reagensa B (promiješani)

Priprema zasićene otopine natrijeva karbonata (20 %-tna otopina):

U 800 mL vruće destilirane vode otopi se 200 g anhidrida natrijeva karbonata, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

Priprema reagensa A:

Odvagati 1,0000 g natrijeva hidroksida i kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 250 mL, te otopiti u maloj količini destilirane vode. Odvagati 5,0000 g anhidrida natrijeva karbonata i kvantitativno prenijeti u otopinu natrijeva hidroksida, otopiti i promiješati otopinu te nadopuniti odmjernu tikvicu do oznake destiliranom vodom.

Priprema reagensa B:

Odvagati 0,0500 g bakrova(II) sulfata pentahidrata i kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 10 mL i otopiti u maloj količini destilirane vode. Odvagati 0,1000 g K, Na-tartarata i kvantitativno prenijeti u otopinu bakrova(II) sulfata pentahidrata, otopiti, promiješati i zatim nadopuniti do oznake destiliranom vodom.

Priprema reagensa C:

U odmjernu tikvicu od 50 mL otpipetirati 50 mL reagensa A potom 1 mL reagensa B te promiješati.

3.1.4 Instrumenti i uređaji

Za mikrovalnu i ultrazvučnu ekstrakciju te određivanje pesticida i teških metala korištena je sljedeća aparatura i pribor:

1. Agilent 1260 Infinity, G1311B, Binary pump, Fluorescent detector (Agilent, Santa Clara, SAD)
2. Analitička vaga (NBL-254i, Nimbus Analytical Balances, Oxford, SAD)
3. Autoflex Speed MALDI TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka)
4. Centrifuga (Rotina 35, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka)
5. GC-MS (GCMS-TQ8050 NX, Nexis GC-2030, Shimadzu, Kyoto, Japan)
6. ICP-MS (ICP-MS 7900, Agilent, Santa Clara, SAD)
7. Kolona za GC-MS: SH-Rxi-5Sil MS 30 m, 0.25 mmID; 0.25 μ m df (Restek, Bellefonte, SAD)

8. Kolona za LC-MS ACQUITY UPLC BEH 150 x 2,1mm; 1,7µm (Waters, Milford, SAD)
9. LC-MS (UPLC-MS/MS, Xevo TQ MS, Waters, Milford, SAD)
10. Magnetska miješalica (Dlab, MS-H-S, Peking, Kina)
11. Mikrovalna pećnica (ultraWAVE, Milestone, Sorisole, Italija)
12. Peć za žarenje (Degetherm Easy 4, Interdent, Celje, Slovenija)
13. Reacti-therm 3 Heat (Thermo Scientific, Waltham, SAD)
14. Sušionik (ST120L, Inkolab, Zagreb, Hrvatska)
15. Synergy Water Purification System (Merck Millipore, Burlington, SAD)
16. Tekućinski kromatograf (UPLC-MS/MS, Xevo TQ MS, Waters, Milford, SAD)
17. Uređaj za mikrovalnu laboratorijsku ekstrakciju (StartSYNTH, Milestone Srl., Sorisole, Italija)
18. Uređaj za zavarivanje (AIE-200, Ankom, Macedon, SAD)
19. UV/VIS spektrofotometar (Lambda 25, PerkinElmer, Waltham, SAD)
20. Vacuum Concentrator plus (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
21. Vortex tresilica (Dlab, MX-S, Peking, Kina)

3.1.5 Programski paketi

Za daljnju analizu podataka korišteni su sljedeći programski paketi:

1. Program za mjerenje: GC-MS Solution (Shimadzu, Kyoto, Japan)
2. Program za analizu podataka: LabSolutions Insight GC-MS (Shimadzu, Kyoto, Japan)
3. Program za analizu podataka: TargetLynxXS (Waters, Milford, SAD)
4. Program za mjerenje: MassLynx (Waters, Milford, SAD)
5. Program za analizu podataka: STATGRAPHICS Centurion (Statgraphics Technologies, Inc., VA, SAD)
6. Program za analizu podataka: SimaPro (PRé Sustainability, LE Amersfoort, Nizozemska)

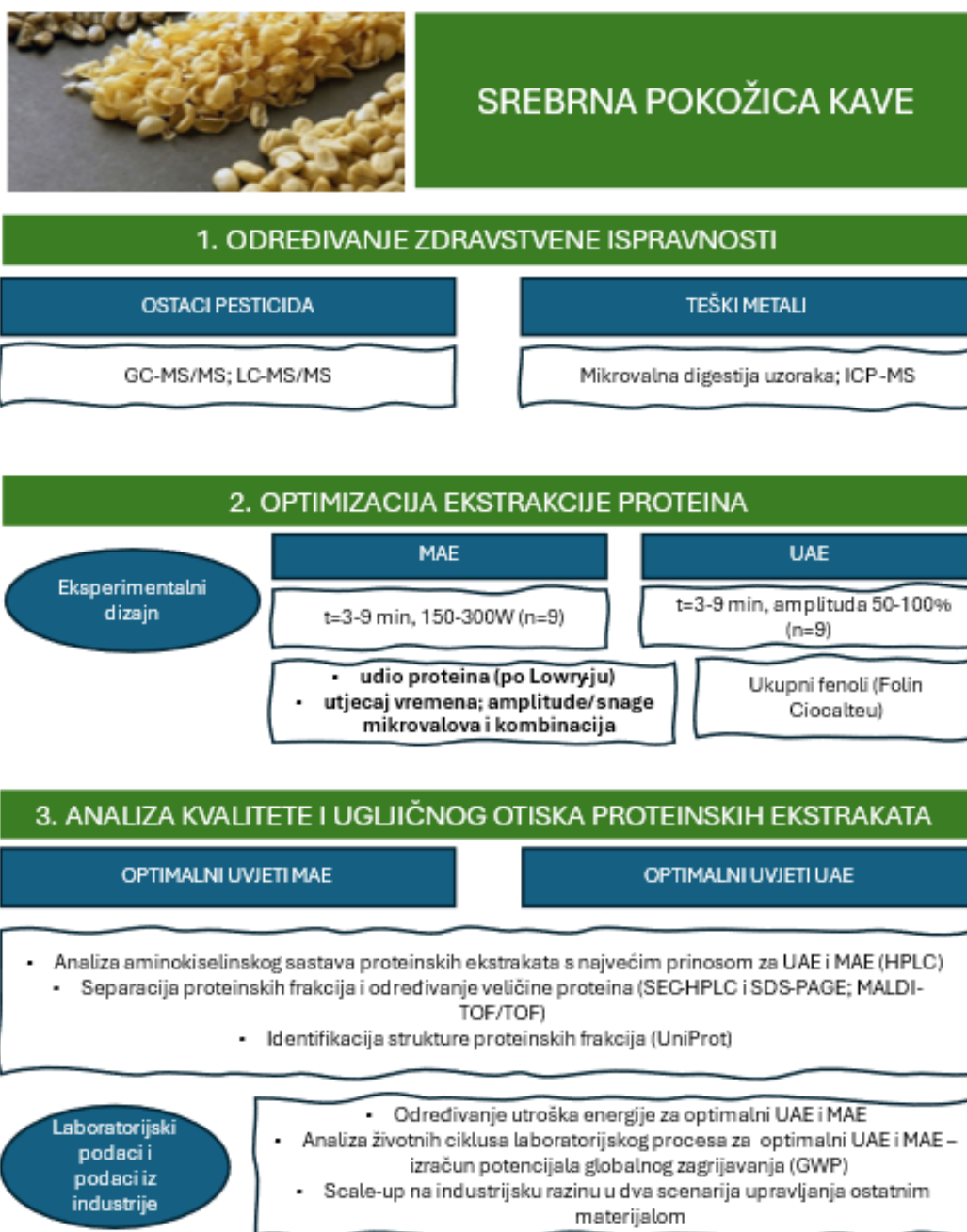
3.2 Plan istraživanja i metodologija

U prvom dijelu istraživanja provedena je analiza zdravstvene ispravnosti SPK i to u skladu s hrvatskim (2) i europskim važećim zakonodavnim okvirima (20, 30) koje uključuje određivanje ostataka pesticida i određivanje sadržaja metala.

Ekstrakcija pesticida provela se primjenom QuEChERS metodologije (71), a ostaci pesticida su kvantificirani pomoću plinske i tekućinske kromatografije povezane s dvostrukom masenom spektrometrijom (GC-MS/MS i LC-MS/MS). Za određivanje udjela teških metala uzorak je pripremljen metodom vlažne mikrovalne digestije, a udio pesticida određivao se primjenom induktivno spregnute plazme povezane s masenom spektroskopijom (ICP- MS) (72).

U drugom koraku, proveden je dizajn eksperimenta za optimizaciju ekstrakcije proteina korištenjem dvije ekstrakcijske tehnike (MAE i UAE) (38, 40, 73). Dizajn eksperimenta je napravljen u programu STATGRAPHICS Centurion (74). Za dizajn eksperimenta je korišten faktorijalni dizajn kako bi se utvrdila statistička značajnost pojedinih varijabli na odabrane izlazne vrijednosti udjela ukupnih proteina i aminokiselina. U drugom dijelu istraživanja definirani su optimalni uvjeti ekstrakcije pri kojima se postižu najviši prinosi proteina uz primjenu metode odzivne površine. Kao otapalo izbora korištena je voda. U okviru provedbe ranijih istraživanja (46) određen je optimalni maseni omjer uzorak/otapalo za obje ekstrakcijske tehnike. Na temelju dobivenih rezultata pripremljene su suspenzije koje sadrže 10 g SPK i deioniziranu vodu u omjeru 1:50 (w/v).

Udio proteina određen je metodom po Lowryju (75). Kvantitativna analiza aminokiselina u dobivenim ekstraktima nakon optimizirane ekstrakcije je provedena koristeći metodu Waters AccQ•Tag, koja obuhvaća hidrolizu, derivatizaciju aminokiselina s AccQ•Fluor derivatizacijskim reagensom te tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (76). Ukupni fenoli i antioksidansi su određeni standardnim spektrofotometrijskim metodama (77). Odjeljivanje i karakterizacija peptida provedeni su postupkom gel filtracijske kromatografije (78). Ekološki otisci optimiziranih ekstrakcijskih postupaka analizirani su postupkom LCA kroz identifikaciju količina potrebne energije i materijala te otpada koji se ispušta u okoliš korištenjem programskog paketa SimaPro (79). Tijek provedenog istraživanja prikazan je na Slici 12.



Slika 12. Tijek provedenog istraživanja

3.2.1 Određivanje zdravstvene ispravnosti srebrne pokožice kave

3.2.1.1 Određivanje ostataka pesticida

Uzorci za određivanje ostataka pesticida pripremljeni su metodom QuEChERS prema Anastassiades i sur. (71). Nakon toga su kvantificirani pomoću plinske ili tekućinske kromatografije povezane s dvostrukom masenom spektrometrijom (ovisno o vrsti pesticida).

Za provedbu QuEChERS ekstrakcije u kivetu od 50 mL odvaže se $2,0 \pm 0,03$ g usitnjenog i homogeniziranog uzorka SPK te se doda 10 g vode. Pesticidi se iz uzorka ekstrahiraju dodatkom 10 mL acetonitrila. Zatim se u smjesu dodaje komercijalno dostupna mješavina soli magnezij-sulfata i natrij-klorida i citratnih soli koje omogućavaju razdvajanje acetonitrilnog od vodenog sloja. Smjesa se snažno izmučka te centrifugira 5 min na >3000 okretaja/min.

Za analizu na LC-MS/MS 100 μ L sirovog acetonitrilnog ekstrakta razrijedi se s 900 μ L vode. Uzorci za analizu na GC-MS/MS-u se centrifugiraju te se iz gornjeg organskog (acetonitrilnog) sloja uzima se alikvot od 6 mL i odvaja se u kivetu s komercijalno dostupnom smjesom soli magnezij-sulfata, primarno sekundarnog amina i GCB-a, s ciljem dodatnog pročišćavanja i uklanjanja pigmenata. Smjesa se dobro promućka te se stavlja na centrifugu 5 min na >3000 okretaja/min. Nakon toga se uzima 1 mL gornjeg sloja iz kivete i prenosi u tamnu vialicu od 1,5 mL (zbog moguće prisutnosti fotosenzibilnih pesticida u uzorku). Takav uzorak spreman je za analizu na GC-MS/MS-u.

Za provedbu analize nužno je pripremiti i uzorke u koje je nacijepljena točno poznata koncentracija standarda kako bi se umanjio utjecaj matriksa na rezultate. Za analizu na GC-MS/MS koncentracija standarda iznosila je 0,002 μ g/mL, a za analizu na LC-MS/MS koncentracija standarda iznosila je 0,05 mg/kg. Uzorci su pripremljeni i analizirani u dvije paralele uzorka te dvije paralele nacijepljenih uzoraka.

Uzorci koji su analizirani plinskom kromatografijom (GC MS-TQ8050 NX) (Slika 13 a) snimani su u programu GC-MS Solution, a podaci su obrađeni u programu LabSolutions Insight GC-MS. Uzorci analizirani tekućinskom kromatografijom (UPLC-MS/MS) (Slika 13 b) snimani su u programu MassLynx (80), a podaci su obrađeni u programu TargetLynxXS (81).



a)

b)

Slika 13. Instrumenti GC-MS/MS (a) i LC-MS/MS (b) korišteni za određivanje ostataka pesticida (vlastite fotografije)

Analize pesticida provedene su akreditiranom i validiranom metodom u nacionalnom referentnom laboratoriju za pesticide u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar.

Kromatografski uvjeti pod kojim su obavljena mjerenja plinskom i tekućinskom kromatografijom prikazani su u Tablici 2. Identifikacija pesticida u uzorku provela se kombinacijom dvaju pristupa - usporedbom retencijskih vremena analitičkih signala uzoraka sa standardima te praćenjem vrijednosti m/z vrijednosti odabranih iona (SIM). Glavni (kvantifikacijski) ion koji se koristi za kvantifikaciju morao je biti prisutan i u uzorku i u standardu s odgovarajućim intenzitetom. Dozvoljeno odstupanje relativnog intenziteta bilo je najviše $\pm 20\%$. Za dio pesticida za koje nije bio dostupan standard identifikacija je izvršena na temelju usporedbe s podacima iz knjižnice masenih spektara (Wiley Registry/NIST Mass Spectral Library 2023). Omjer površine ispod pika u uzorku i pojedinom standardu daje kvantitativnu informaciju tj. koncentraciju pesticida prisutnog u uzorku.

Tablica 2. Kromatografski uvjeti GC-MS/MS-a i LC-MS/MS-a

	GC-MS/MS	LC-MS/MS
<i>Instrument</i>	GCMS-TQ8050 NX, Nexis GC-2030, Shimadzu	UPLC-MS/MS, Xevo TQ MS, Waters
<i>Kolona</i>	SH-Rxi-5Sil MS 30 m, 0,25 mmID; 0,25 μ m df, Restek	ACQUITY UPLC BEH 150 x 2,1mm; 1,7 μ m, Waters
<i>Mobilna faza</i>	Helij	A: 5mM amonij-formijat u smjesi vode i metanola (9:1) B: 5mM amonij-formijat u metanolu
<i>Protok</i>	1,4 mL/min	0,4 mL/min
<i>Temp. kolone</i>	105 °C	50 °C
<i>Temp. injektora</i>	290 °C	10 °C
<i>Temp. ionskog izvora</i>	250 °C	150 °C
<i>Volumen injektiranja</i>	1,0 μ l	30 μ l
<i>Vrijeme analize</i>	40,25 min	20 min
<i>Gradijent</i>	Temperaturni gradijent kolone: Početna temperatura: 50 °C (zadržavanje 1 min) Stopa zagrijavanja 1: 25 °C/min do 150 °C Stopa zagrijavanja 2: 10 °C/min do 250 °C Stopa zagrijavanja 3: 5 °C/min do 300 °C (zadržavanje 5 min)	Gradijent mobilne faze: 0 – 0,5 min; 0% B 0,5 – 3,0 min; 0→55% B 3,0 – 8,0 min; 55→62% B 8,0 – 10,0 min; 62→64% B 10,0 – 12,0 min; 64→85% B 12,0 – 15,0 min; 85→100% B 15,0 – 17,0 min; 100% B 17,0 – 17,1 min; 100→0% B

3.2.1.2 Određivanje teških metala

Za određivanje teških metala uzorak SPK najprije se razgrađuje postupkom mikrovalne digestije, nakon čega se udio metala određuje primjenom ICP-MS-a. U teflonsku kivetu uređaja za mikrovalnu ekstrakciju se najprije odvaže 0,5 g usitnjenog i homogeniziranog

uzorka SPK. U tako odvagani uzorak dodaje se 1 mL vode i ostavi stajati 1 sat nakon čega se dodaje 3 mL koncentrirane dušične kiseline te 1 mL 30 %-tnog vodikovog peroksida. Kiveta s uzorkom se zatvori te se stavlja u bubanj za mikrovalnu razgradnju (Slika 14). Po završetku postupka razgradnje, uzorak se hladi te se kiveta otvara, a bistra otopina se preko staklenog lijevka uz ispiranje deioniziranom vodom, kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 25 mL.

Nakon što je uzorak pripremljen i spreman za mjerenje, ne smije sadržavati suspendirane čestice, u suprotnom se naknadno obrađuje. Prije početka mjerenja pripremaju se standardne otopine za kalibracijski pravac, nakon čega se pristupa mjerenju uzoraka. Uzorak je pripremljen i analiziran u dvije paralele.



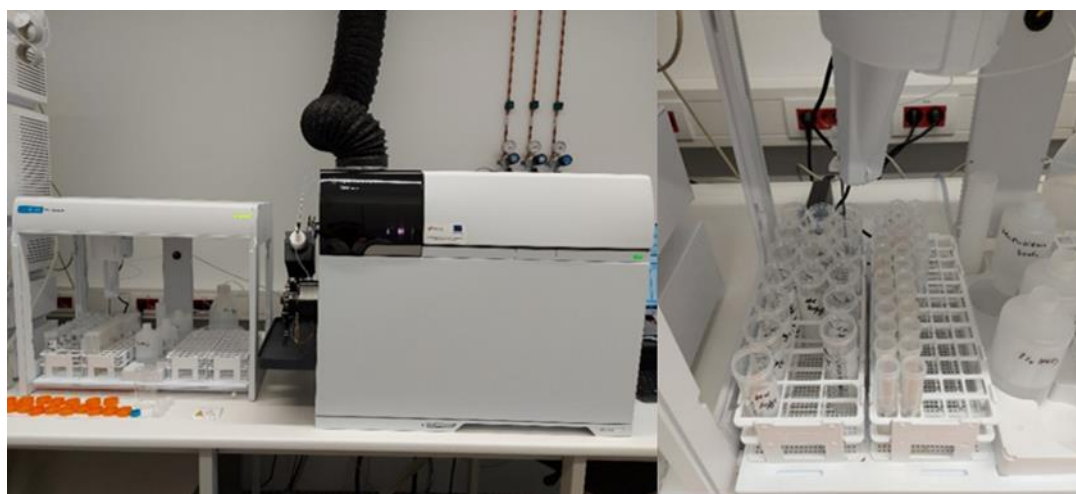
Slika 14. Jedinica za mikrovalnu digestiju korištena za razgradnju uzorka (vlastita fotografija)

Za analizu elemenata korištena je induktivno spregnuta plazma s masenim detektorom (ICP-MS 7900) (Slika 15 a) i automatskim uzorkivačem (Slika 15 b), prema uvjetima odnosno ključnim postavkama za postizanje optimalnih performansi ICP-MS sustava, u Tablici 3. Za rad instrumenta koriste se plinovi: argon čistoće 99,9995 % i helij čistoće 6,0 %. Pojedinačni standardi korišteni su za pripremu kalibracijskih pravaca. Za kalibracijski pravac svakog elementa postignuta je linearnost od $\geq 0,999$. Korišten je interni standard

(Bi, Sc, Y, Ge) koncentracije 100 µg/L.

Tablica 3. Tehnički parametri za analizu ICP-MS

<i>ICP-MS</i>	
<i>Raspršivač</i>	MicroMist
<i>Injektor</i>	Kvarcni
<i>Konusi</i>	Nikal
<i>Rf-snaga</i>	1180 W
<i>Protok plina plazme</i>	15,0 L/min
<i>Protok plina raspršivača</i>	1,07 L/min
<i>Protok pomoćnog plina</i>	0,90 L/min
<i>Vrijeme integriranja</i>	1000 ms
<i>Točke po piku</i>	100
<i>Broj replika</i>	5
<i>Vrijeme odgode</i>	30 s
<i>Vrijeme ispiranja</i>	70 s



a)

b)

Slika 15. Instrument ICP-MS korišten za određivanje teških metala (a); dio za automatsko uzorkovanje (b) (vlastite fotografije)

3.2.2 Optimizacija ekstrakcije proteina i polifenola iz srebrne pokožice kave postupkom mikrovalne ekstrakcije

Mikrovalna ekstrakcija uzoraka SPK provedena je korištenjem zatvorenog sustava za mikrovalnu ekstrakciju s deioniziranom vodom kao ekstrakcijskim sredstvom. Ekstrakcija je provedena uređajem za mikrovalnu ekstrakciju (Slika 16).



Slika 16. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju (vlastite fotografije)

Dizajn eksperimenta za optimizaciju MAE je napravljen u programu STATGRAPHICS Centurion (74). Eksperiment je organiziran u faktorijskom dizajnu, gdje su nezavisne varijable snaga i vrijeme tretiranja. Ulazni parametri su snaga i vrijeme tretiranja, a izlazni parametar je prinos proteina, uz monitoring prinosa ukupnih polifenola. Snaga je varirana u vrijednostima 100, 150 i 200 W, a vrijeme 3, 6 i 9 minuta te je testirano ukupno 9 uvjeta (Tablica 4). Svaka ekstrakcija je provedena u duplikatu ($n=18$). Rezultati su analizirani korištenjem jednosmjerne analize varijance (ANOVA) kojom je određena statistička značajnost parametara snage i vremena na prinose ukupnih proteina i polifenola. Kao statistički značajni parametri uzeti su oni čija je p -vrijednost manja od 0,05. Također su izrađeni dijagrami odzivnih površina eksperimentalnih podataka te jednadžbe eksperimentalnih modela. Na temelju dobivenih podataka utvrđeni su optimalni uvjeti ekstrakcije.

Tablica 4. Dizajn eksperimenta optimiziranja uvjeta kod mikrovalne ekstrakcije

Oznaka uzorka	Snaga (W)	Vrijeme (min)
M1	100	6
M2	200	9
M3	100	9
M4	200	3
M5	200	6
M6	150	6
M7	150	9
M8	100	3
M9	150	3

Ekstrakcija je provedena na način da je u staklenu tikvicu s okruglim dnom odvagano 10 g uzorka SPK, koji je prethodno usitnjen i prosijan. U tikvicu je dodano 100 mL deionizirane vode te magnet za miješanje. Tikvica s uzorkom se smješta u uređaj za mikrovalnu ekstrakciju. Na upravljačkoj ploči uređaja namještaju se željeni parametri (vrijeme i snaga). Nakon završetka ekstrakcije, dobiveni ekstrakt se hladi, filtrira, a dobiveni filtrati se koriste za daljnje analize.

3.2.3 Optimizacija ekstrakcije proteina i polifenola iz srebrne pokožice kave postupkom ultrazvučne ekstrakcije

Ultrazvučna ekstrakcija polifenola i proteina iz SPK provedena s uređajem Ultrasonic processor Q700, SAD (Slika 17) korištenjem deionizirane vode kao ekstrakcijskog sredstva.



Slika 17. Uređaj za ultrazvučnu ekstrakciju Q700 (vlastita fotografija)

Eksperimentalni dizajn je, kao i kod mikrovalne ekstrakcije, napravljen korištenjem računalnog programa STATGRAPHICS Centurion. Ulazni parametri bili su vrijeme (3, 6 i 9 min) i amplituda (50, 75 i 100 %) uz uvjet da temperatura ne smije prijeći 40 °C kako bi se spriječila denaturacija proteina. Na taj način testirano je 9 ekstrakata (Tablica 5). Izlazni parametar bio je prinos proteina uz monitoring udjela polifenola. Svaka ekstrakcija je provedena u duplikatu (n=18).

Tablica 5. Dizajn eksperimenta za optimizaciju uvjeta UAE proteina iz SPK

Oznaka uzorka	Amplituda [%]	Vrijeme [min]
U1	100	6
U2	75	6
U3	100	9
U4	50	9
U5	75	9
U6	75	3
U7	50	6
U8	100	3
U9	50	3

Kako bi se proveo postupak ekstrakcije, u laboratorijsku čašu od 250 mL odvaže se 10 g uzorka osušene, usitnjene i prosijane SPK koja se pomiješa sa 100 mL destilirane vode na sobnoj temperaturi (22 °C). U plastičnu posudu se stave kockice leda te mala količina hladne vode. Laboratorijska čaša s uzorkom se uroni u posudu s ledom i stavi u podnožje ultrazvučne sonde uređaja. Ultrazvučna sonda je smještena u zvučnoj izolacijskoj kutiji iz sigurnosnih razloga. Ultrazvučna sonda se uroni u sredinu uzorka na način da se nalazi oko 2 cm ispod površine uzorka. Također, u uzorak se uroni termo-članak pri čemu treba paziti da termo-članak ne dodiruje stijenku čaše i ultrazvučnu sondu kako bi dobili ispravnu temperaturu uzorka. Zatvore se vratašca izolacijske kutije. Na kontrolnom ekranu uređaja podese se odgovarajući parametri ekstrakcije. Tijekom trajanja tretmana važno je obratiti pažnju da temperatura uzorka ne smije prijeći 40 °C. Također, tijekom tretiranja evidentirani su parametri snage, temperature i energije prikazani na kontrolnom ekranu uređaja. Kako bi se pratila promjena energije u intervalu od 15 sekundi, tijekom trajanja tretmana je izračunata ukupna promjena energije u određenom vremenu obzirom na specifični toplinski kapacitet uzorka. Dobiveni ekstrakt se filtrira preko Büchnerovog lijevka i prikuplja u Falcon epruvete za daljnje analize. Kod ultrazvučnog tretmana pratila se promjena temperature tijekom postupka kako bismo utvrdili stvarnu snagu (zato se prati kalorimetrijska promjena u sustavu).

Ukupna promjena energije računa se prema izrazu [1]:

$$P = m \cdot c_p \cdot (dT/t) \quad [1]$$

gdje je:

P - ukupna promjena energije (J s^{-1});

m - masa uzorka (g);

c_p - specifični toplinski namirnice ($\text{J K}^{-1} \text{g}^{-1}$);

dT - promjena temperature u točki T_1 i T_2 (K);

t - vremenski interval (s)

Specifični toplinski kapacitet uzorka računa se prema izrazu [2]:

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

gdje je:

c_p – specifični toplinski kapacitet uzorka ($\text{J K}^{-1} \text{g}^{-1}$);

x_n - udio određenog sastojka;

c_{pn} - specifični toplinski kapacitet sastojka ($\text{J K}^{-1} \text{g}^{-1}$)

3.2.4 Određivanje sadržaja i karakterizacija proteina srebrne pokožice kave

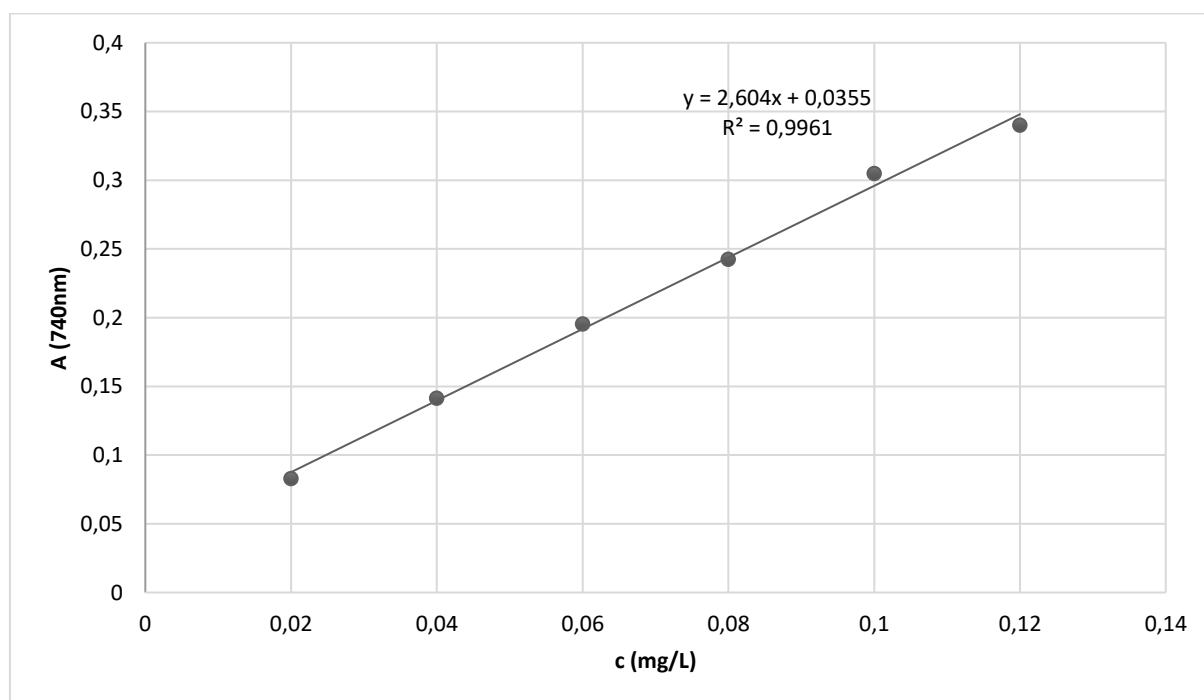
3.2.4.1 Određivanje ukupnih proteina metodom po Lowryju

Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowryju provedeno je spektrofotometrijski. Metoda se temelji na reakciji Cu^{2+} s peptidnim vezama proteina u lužnatom mediju, gdje dolazi do redukcije Cu^{2+} u Cu^+ . Dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa u reakcijsku smjesu dolazi do reakcije s Cu^+ -protein kompleksom i s pobočnim lancima tirozina, triptofana i cisteina čime se stvara najprije nestabilni kompleks, koji se postepeno reducira i daje plavo obojenje (82).

Za provedbu pokusa 10 mL ekstrakta se otpipetira u Falcon epruvetu te se doda 40 mL acetona kako bi se istaložili proteini. Tad se Falcon epruveta pohrani kroz 15 minuta pri -18°C . Potom se uzorak temperira na sobnu temperaturu i centrifugira pri 10000 okretaja / 10 minuta. Supernatant se odvoji od taloga dekantiranjem. Talog se potom ispiri s 10 mL acetona i zatim otopi u 10 mL destilirane vode. Tako dobiveni uzorci se razrijede pet puta

prije određivanja koncentracije proteina. U staklenu epruvetu se otpipetira 0,4 mL uzorka i 2 mL reagensa C te se sadržaj promiješa i inkubira na sobnoj temperaturi 10 – 15 minuta. Potom se u ovu epruvetu naglo dodaje 0,2 mL Folin-Ciocalteu reagensa uz miješanje na Vortexu. Sadržaj epruvete se zatim inkubira na sobnoj temperaturi 40 do 60 minuta. Apsorbancija se mjeri na valnoj duljini elektromagnetskog zračenja od 740 nm. Kod pripreme slijepe probe slijedi se isti postupak, ali se umjesto uzorka u reakcijsku smjesu dodaje 0,4 mL destilirane vode.

Za izradu baždarnog dijagrama iz standardne otopine proteina koncentracije 200 mg/mL, u odmjernu tikvicu od 10 mL pripreme se otopine poznate koncentracije proteina 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1 i 0,12 mg/L. Nakon toga se provodi prethodno opisani postupak i mjerenje apsorbancije u uzorcima poznatih koncentracija. Iz navedenih podataka konstruira se baždarni pravac te se izračuna jednadžba pravca pomoću koje se izračunava koncentracija proteina u dobivenim ekstraktima (Slika 18).



Slika 18. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije (A_{740}) o koncentraciji proteina

3.2.4.2 Određivanje aminokiselinskog sastava uzoraka

Kvantitativna analiza aminokiselina provedena je koristeći metodu Waters AccQ•Tag prema uputama proizvođača (Waters, Milford, SAD) (76), a obuhvaća hidrolizu, derivatizaciju aminokiselina s AccQ•Fluor derivatizacijskim reagensom AccQ•Fluor Reagent te HPLC kvantitativnu analizu. Za hidrolizu proteina 5 μ L svakog ekstrakta upareno je do suha u vakuum koncentratoru. Talog je otopljen u 200 μ L 6 M HCl uz dodatak 4 % fenola. Hidroliza je provedena tijekom 24 sata pod vakuumom pri 114 °C. Dobiveni hidrolizat je uparen do suha u vakuum koncentratoru pri 60 °C. Nakon sušenja, uzorak je otopljen u 20 μ L 20 mM HCl. Derivatizacija aminokiselina je provedena koristeći AccQ•Fluor Reagent prema uputama proizvođača (Waters AccQ•Tag Chemistry Package Instruction Manual). Nakon derivatizacije, uzorci su filtrirani kroz filter veličina pora 0,2 μ m. Standardna otopina aminokiselina koncentracije 2,5 mM je razrijeđena do koncentracije od 100 pmol/ μ L. Separacija derivatiziranih aminokiselina je provedena prema metodi opisanoj u Tablici 6.

Tablica 6. Parametri HPLC metode korištena za određivanje aminokiselinskog sastava uzorka

Uvjeti kromatografske separacije i eluacije	Gradijentna elucija:		
	Vrijeme (min)	% Mobilna faza A	% Mobilna faza B
	0,0	98,0	2,0
	0,5	98,0	2,0
	15,0	93,0	7,0
	19,0	90,0	10,0
	28,0	74,0	26,0
	35,0	67,0	33,0
	36,0	67,0	33,0
	37,0	0,0	100,0
	45,0	0,0	100,0
	46,0	98,0	2,0
	52,0	90,0	2,0
	Kolona: Waters AccQ•Tag, 3.9x150 mm Volumen injekt. uzorka: 1 µL Volumen injekt. standarda: 5 µL Detekcija: ekscitacija: 250 nm, emisija: 395 nm Protok mobilne faze 1,0 mL/min Mobilna faza A: Waters AccQ•Tag eluent A Mobilna faza B: Acetonitril/Milli-Q voda = 60/10 (v/v) Temperatura kolone: 37 °C		
Standard	Smjesa derivatiziranih aminokiselina (amino acid standard H mixture, Waters) u koncentraciji 100 pmol/µL		

3.2.4.3 Karakterizacija proteina

U okviru karakterizacije proteina provedena je gel filtracijska kromatografija (engl. *size exclusion chromatography*) i SEC-HPLC analiza. Svrha analize je utvrditi i analizirati veličinu molekula proteina ili peptida te odrediti njihovu molekularnu masu (M_r) korištenjem spektrometrije masa. Smjesa proteina poznate molekulske mase korištena je za određivanje molekulske mase uzoraka. Također je provedena elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis*, *SDS- PAGE*). Digestija proteina u gelu i priprema uzoraka za spektrometriju masa provela se prema protokolu opisanom u Shevchenko i sur. (83).

Uzorci su pripremljeni kako bi se osigurala optimalna reakcija sa SDS-om, odnosno zagrijavanjem uzorka u odgovarajućem puferu (koji sadrži SDS i merkaptetanol) barem dvije minute na 100 °C. Pri denaturaciji uzorci se moraju pomiješati s dostatnom količinom pufera, koja ovisi o koncentraciji proteina u uzorku. Pri denaturaciji proteini vežu SDS u približno konstantnom masenom odnosu rezultirajući nastajanjem SDS-proteinskih kompleksa ujednačene gustoće naboja koji će tijekom elektroforeze migrirati brzinom koja ovisi primarno o njihovoj molekularnoj masi. U takvim je uvjetima odnos $\log_{10} M_r$ (mase proteinskog fragmenta) i R_f vrijednosti (udaljenosti koju prijeđe protein prema udaljenosti koju prijeđe boja) strogo linearan. Za kalibraciju gel sustava koristi se set proteina poznatih molekularnih masa koji se razdvoji, a potom i vizualizira zajedno s analiziranim uzorcima. Za izradu kalibracijskog pravca izračunaju se R_f vrijednosti markera i na semilogaritamskoj skali ucrtaju u odnosu na molekularne mase. Nakon toga se R_f vrijednosti proteina u uzorcima koriste kako bi se iz kalibracijskog pravca očitala njihova molekularna masa.

Nakon razdvajanja proteina SDS-PAGE metodom i njihove digestije u gelu, provedena je analiza dobivenih peptida MALDI-TOF/TOF metodom (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight*) spektrometra masa (engl. *mass spectrometry*, *MS*). Proteini su identificirani usporedbom dobivenih spektara s onima u bazi podataka UniProt. Nakon snimanja MS i MS/MS spektara, dobiveni podaci su korišteni za identifikaciju peptida tj. proteina kroz njihovu usporedbu sa spektrima u dostupnim bazama podataka. Analiziran je i aminokiselinski sastav ekstrakta SPK. Separacija proteina provedena je koristeći parametre opisane u Tablici 7. Za provedbu natrijev dodecil sulfat – elektroforeze u poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel*

electrophoresis, SDS- PAGE) u uzorak volumena 1260 μ L dodano je 15 μ L 10 % vodene otopine natrijevog deoksikolata te 225 μ L 50 % vodene otopine trikloroctene kiseline. Proteini su taloženi na ledu tijekom 2 h te izdvojeni centrifugiranjem pri $10000 \times g$ tijekom 10 min pri 4 °C. Talog je ispran dva puta s koncentriranim ledenim tetrahidrofuranom. Naposljetku, talog je otopljen u 50 μ L 50 mM trietilamonijevog bikarbonata. Separacija proteina se provela uz upotrebu Invitrogen™ Novex™ Tris-Glycine, 4 – 12 %, 1,5 mm gela prema uputama proizvođača (Fisher Scientific, 2019).

Otopina za fiksiranje gelova pripremljena je miješanjem 250 mL metanola i 50 mL octene kiseline u odmjernoj tikvici od 500 mL koja je zatim nadopunjena deioniziranom vodom do oznake. Otopina Coomassie brilliant blue alkoholne boje za bojanje gelova pripremljena je otapanjem 0,125 g boje Coomassie brilliant blue G250 u 100 mL deionizirane vode. U tako pripremljenu otopinu dodano je 125 mL metanola i 25 mL octene kiseline. U odmjernoj tikvici od 100 ml pripremljena je otopina za dekoloraciju, miješanjem 7 mL ledene octene kiseline i 10 mL metanola uz dopunjavanje deioniziranom vodom do oznake. Gel je inkubiran u otopini za fiksiranje kroz jedan sat, a zatim u Coomassie brilliant blue otopini tijekom 10 minuta. Otopina za bojanje se potom odbacuje, a gel se inkubira u otopini za odbojavanje pri sobnoj temperaturi do obezbojenja pozadine.

Tablica 7. SEC-HPLC metoda korištena pri separaciji proteina na temelju njihove veličine

Uvjeti kromatografske separacije i elucije	Kolona:	3 μm, 4,6 x 300 mm, BioSec-3, Agilent	
	Volumen injekt. uzorka:	10 μL	
	Volumen injekt. standarda:	5 μL	
	Detekcija:	215	
	Protok mobilne faze:	0,3 mL/min	
	Mobilna faza:	145 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0	
	Temperatura kolone:	20 °C	
	Elucija:	Izokratna	
Standard	Smjesa proteina poznate molekulske mase korištena za određivanje molekulske mase uzoraka:		
	Protein	Molekulska masa (kDa)	RT (min)
	tireoglobulin	670	6,890
	γ-globulin	158	
	ovalbumin	44	7,538
	mioglobin	17	8,268
	Vitamin B12	1,35	12,226

RT (engl. *retention time*), retencijsko vrijeme

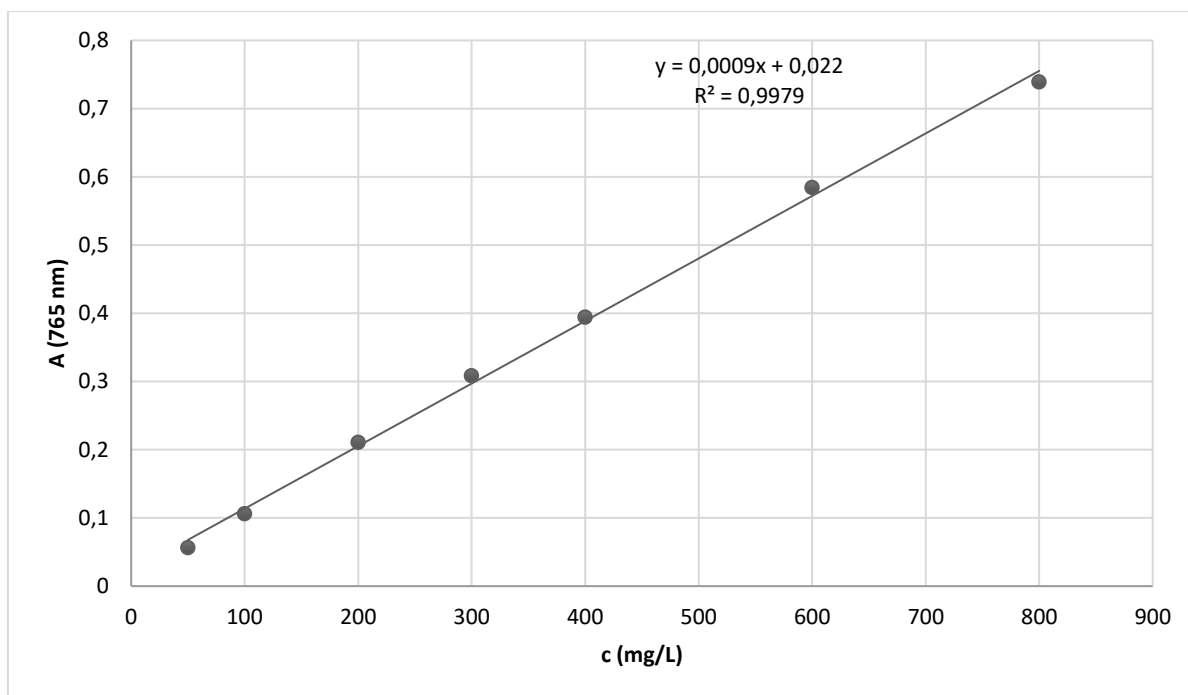
Prilikom provođenja SDS-PAGE pokretljivost proteina u gelu ovisi o gustoći naboja (omjer naboja i mase proteina). Što je gustoća naboja proteina veća, to protein brže putuje kroz gel u električnom polju. Kod SDS-PAGE metode natrijev dodecil sulfat se veže na proteine (sulfat) i tako protein ima negativan neto naboj. Tako svi proteini imaju jednaku gustoću naboja, pa njihovo razdvajanje u gelu ovisi samo o njihovoj masi. Analiza peptida provedena je uz pomoć MALDI-TOF/TOF spektrometra masa Autoflex Speed (Bruker, Njemačka) s parametrima - Parametri MS/MS analize peptida spektrometrom masa (84). Nakon snimanja MS i MS/MS spektara, dobiveni podaci su korišteni za identifikaciju peptida tj. proteina kroz njihovu usporedbu sa spektrima u dostupnim bazama podataka uz pomoć programa ProteinScape, verzija 3.0 (Bruker, Njemačka). Kreirana je *in house* baza podataka spektara proteina *Coffea canephora*. Sekvence odgovarajućih proteina preuzete su iz UniProt baze podataka (26073 unosa) (85).

3.2.5 Određivanje ukupnih polifenola srebrne pokožice kave

Metoda spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola u vodenom ekstraktu temelji se na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim reagensom. U reakciji Folin–Ciocalteu reagens, koji je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline, reagira s fenoksid–ionom iz uzorka. Pri tome se fenoksid–ion oksidira, a Folin–Ciocalteu reducira do volfram i molibden oksida, koji su plavo obojeni. Intenzitet plavog obojenja se odredi spektrofotometrijski pri 765 nm (86). Intenzitet plavog obojenja je proporcionalan koncentraciji polifenola u uzorku.

Dobiveni ekstrakt SPK razrijeđen je s vodom dva puta. U staklenu epruvetu redom se otpipetira 0,1 mL uzorka (razrijeđenog ekstrakta), 7,9 mL destilirane vode te 0,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa, koji je prethodno razrijeđen s vodom u omjeru 1 : 2. Dobivena smjesa se promiješa i doda joj se 1,5 mL 20 %-tne otopine Na_2CO_3 . Sadržaj epruvete se ponovno dobro promiješa na Vortex uređaju. Pripremljeni uzorci ostave se stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija plavog obojenja smjese pri 765 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se pripremi na isti način kao i ispitivani uzorci, ali se pritom umjesto uzorka u reakcijsku smjesu dodaje 0,1 mL destilirane vode.

Za izradu baždarnog dijagrama korištena je otopina standarda galne kiseline koncentracije 1000 mg/L koja se razrjeđuje vodom u određenim omjerima kako bi se dobile otopine koncentracija 50, 100, 200, 300, 400, 600 i 800 mg/L. Nakon toga se provodi prethodno opisani postupak određivanja polifenola, uz to da se u prvom koraku umjesto 0,1 mL uzorka dodaje 0,1 mL pripremljenih otopina galne kiseline. Izmjeri se apsorbancija pri 765 nm (A_{765}). Iz dobivenih vrijednosti apsorbancije i poznatih koncentracija otopina galne kiseline izrađuje se baždarni dijagram s pripadajućom jednadžbom pravca (Slika 19).



Slika 19. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije (A_{765}) o koncentraciji galne kiseline

3.2.6 Određivanje potencijala globalnog zatopljenja (GWP) kod procesa dobivanja ekstrakata srebrne pokožice kave

Potencijal globalnog zatopljenja (*engl. global warming potential - GWP*) kod procesa dobivanja ekstrakata SPK izračunat je primjenom metode analize životnog ciklusa (*engl. life cycle assessment - LCA*). Glavni utjecaji na okoliš kod postupka dobivanja ekstrakata SPK povezani su s potrošnjom električne energije, što primarno ovisi o snazi i vremenu potrebnom za ekstrakciju.

Energija potrošena u kilovat-satima (kWh) izračunata je prema izrazu [3]:

$$E \text{ (kWh)} = \frac{P \text{ (W)} \times t \text{ (min)}}{60 \times 1000} \quad [3]$$

Gdje su:

P - snaga (W)

t - vrijeme (min)

Za izračun snage kod UAE računa se snaga prilagođena amplitudi probe prema izrazu [4]:

$$P \text{ pril. (W)} = P \text{ uk. (W)} \text{ (amplituda (\%))} / 100 \quad [4]$$

Uz preračunavanje Emisijskog faktora koji iznosi 0,51848 kg CO₂/kWh, može se izračunati emisija CO₂ (kg) pa je tako izraz globalnog zatopljenja [5]:

$$GWP = \text{Potrošnja energije (kWh)} \times \text{Emisijski faktor (kg CO}_2\text{/kWh)} \quad [5]$$

pri čemu se emisijski faktor uzima iz tabličnih vrijednosti Međunarodne agencije za energiju (IEA) i Europske agencije za okoliš (EEA).

Za potpuni izračun GWP dodatno su korištenjem baza podataka CCaLC2 (School of Chemical Engineering and Analytical Science (CEAS), Manchester, UK) ili Ecoinvent (Ecoinvent, Zürich, Švicarska) prikupljeni podaci o emisijama stakleničkih plinova koji nastaju tijekom različitih faza životnog ciklusa SPK (87). Uz potrošnju energije, glavni parametri uključuju još emisije CO₂, energetske potrošnje, transport, količinu otpada i određivanje potencijala za kompostiranje.

GWP ekstrakata SPK izračunat je na temelju podataka potrošnje energije kod ekstrakcijskih postupaka te iz dostupnih procesnih podataka za proizvodnju kave u Hrvatskoj i to prema dva scenarija: odlaganje otpada i kompostiranje (aerobna fermentacija organske tvari u otpadu). Nakon što je za svaki scenarij dobivena količina emisija određenog stakleničkog plina, te količine se pretvaraju u ekvivalentne količine CO₂ kako bi se dobili izračuni za GWP (88, 89).

4. REZULTATI

4.1 Zdravstvena ispravnost srebrne pokožice kave

Jedan od ciljeva ovoga rada bilo je utvrditi zdravstvenu ispravnost SPK, a što uključuje određivanje ostataka pesticida i udjela teških metala (prema važećim pravilnicima) u sirovini. Na taj način utvrdit će se mogućnost daljnjeg korištenja u proizvodnji funkcionalnih sastavnica za primjenu u prehrambenoj ili farmaceutskoj industriji.

4.1.1 Udio ostataka pesticida

U Prilogu 1 navedeno je ukupno 128 pesticida koji su se nakon optimizacije metode mogli uspješno kvantificirati pomoću primijenjene GC-MS/MS (uzevši u obzir prisutnost karakterističnih nečistoća u SPK i vrlo složenu matricu uzorka). U Prilogu 2 navedeni su pesticidi koji su analizirani pomoću LC-MS/MS-a (5 s najmanjim i 5 s najvećim vremenom zadržavanja od ukupno 285), uz podatke o podudaranju matrica, standardu i iskorištenju. Od ukupno 265 analiziranih pesticida, u uzorku SPK detektirana su samo 3 pesticida LC-MS/MS metodom: flutriafol, imidakloprid i piperonil butoksid. Prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Ostaci pesticida u uzorku SPK

	Pesticid	Koncentracija (mg/kg)	RT (min)	Molekulski/ fragmentni/ kvantifikacijski ioni (m/z)
1	Flutriafol	0,012±0,002	7,97	291/ 213, 176, 103/ 291
2	Imidakloprid	0,016±0,002	5,29	255/ 209, 176, 150/ 255
3	Piperonil butoksid	0,002±0,000	15,4	285/ 267, 137, 121/ 285

U **Prilogu 3** su prikazani kromatogrami pesticida flutriafola. Retencijsko vrijeme je vrijeme za koje analit prođe kroz kromatografski sustav u određenim uvjetima i prikazano je na x-osi. Na y-osi je prikazan % istraživane komponente (flutriafola). Dobiven pik na kromatogramu koristi se za identifikaciju određene tvari, dok visina pika (odnosno površina ispod pika) daje kvantitativni podatak o udjelu (količini) tvari u uzorku.

Rezultati analize ostataka pesticida pokazali su da su uzorci SPK, s obzirom na količinu ostataka pesticida, a sukladno Uredbi komisije EU, sigurni za ljudsku prehranu i stoga se mogu koristiti kao sastojak za funkcionalnu hranu, dodatke prehrani i kozmetiku (20). Ovi rezultati su vrlo važni i nisu u skladu s nekim prethodnim istraživanjima koja su ustanovila da su pronađeni razni ostaci pesticida u sjemenci kave koji mogu predstavljati rizik za potrošače (90-93).

Otkriveni pesticid flutriafol je kontakti i sistemski fungicid koji pripada klasi triazola. Koristi se na raznim žitaricama i za tretiranje sjemena. Njegov mehanizam djelovanja je inhibicija biosinteze ergosterola i stoga poremećaj sinteze stanične stijenke gljivica (94). Imidakloprid pripada skupini neonikotinoidnih/nitroguanidinskih spojeva koji se koriste kao insekticidi. Djeluje kao antagonist vezanjem na postsinaptičke nikotinske receptore u središnjem živčanom sustavu insekata. To se uvelike koristi na gotovo svim usjevima (95). Piperonil butoksid korišten je u insekticidnim formulacijama više od 50 godina i uvijek u kombinaciji s drugim insekticidima, kao što su piretrin, sintetski piretroidi, organofosfati i karbamati. Piperonil butoksid sam po sebi nije insekticid, ali je vrlo dobar sinergist i pojačava njegovo djelovanje u kombinaciji s drugim insekticidima. Omogućuje da više toksina dođe do ciljane molekule, što povećava smrtnost ciljnog organizma (96). Na kraju, kada se usporede rezultati istraživanja sjemenke kave (97) i rezultati dobiveni ovim istraživanjem, utvrđeno je da nusproizvod kave sadrži puno manje pesticida i to u vrlo malim količinama. Razlog tome je vjerojatno to što zrno kave prije komercijalizacije prolazi kroz proces prženja na visokim temperaturama, što dovodi do razgradnje pesticida (98).

4.1.2 Udio teških metala

Teški metali su skupina elemenata s gustoćom većom od 5 g/cm³, što uključuje velik broj metala pa čak i neke mikromineralne. Zbog svoje postojanosti, visoke toksičnosti i sklonosti akumulaciji u ekosustavu, predstavljaju značajnu opasnost za žive organizme (99). U uzorku SPK detektirana su četiri teška metala: nikal, olovo, arsen i kadmij te su njihove koncentracije u uzorcima prikazane u usporedbi s MRO definiranim za dodatke prehrani (Tablica 9).

Tablica 9. Količina teških metala u uzorku SPK

	Teški metal	Koncentracija (mg/kg)	MRO (mg/kg)
1	Nikal	2,495±0,055	<i>nije određen</i>
2	Olovo	0,249±0,077	3,000*
3	Arsen	0,107±0,018	0,200**
4	Kadmij	0,106±0,002	1,000

*MRO za dodatke prehrani; **MRO za rižu

Teški metal koji je u SPK bio zastupljen u najvišim koncentracijama bio je nikal ($2,495 \pm 0,055$ mg/kg), dok su u puno manjim količinama bili prisutni olovo ($0,249 \pm 0,077$ mg/kg), arsen ($0,107 \pm 0,018$ mg/kg) i kadmij ($0,106 \pm 0,002$ mg/kg). Prema Uredbi Komisije br. 2023/915 SPK bi se mogla svrstati u skupinu dodataka prehrani, s obzirom da bi se u tu svrhu mogla koristiti u budućnosti. Prema zahtjevima te Uredbe maksimalno dopuštena količina olova u dodacima prehrani je 3,0 mg/kg. S obzirom da je u uzorku SPK detektirano $0,249 \pm 0,077$ mg/kg olova, može se utvrditi da detektirana količina olova ne predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje. Nadalje, Uredbom je definirano da maksimalno dopuštena količina kadmija u dodacima prehrani može iznositi 1,0 mg/kg. U ovom radu je dokazano da kadmija u uzorku SPK ima u količini od $0,106 \pm 0,002$ mg/kg što ulazi u granice dopuštenih vrijednosti, te kadmij ne predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje. Količina arsena u SPK detektirana je u količini od $0,107 \pm 0,018$ mg/kg. Arsen je prisutan u mnogim namirnicama zbog apsorpcije iz tla i vode (riža primjerice, u usporedbi s drugom vrstom hrane, može apsorbirati veće količine arsena, a s obzirom da je njena konzumacija visoka u cijelom svijetu može doprinijeti velikom izlaganju arsenu). Komisija Codex Alimentarius je, kako bi zaštitila potrošače od prekomjerne izloženosti, preporučila da razina arsena u riži ne smije prelaziti 0,2 mg/kg (100). Još uvijek nije donesen zakon o maksimalnoj količini arsena u ostalim vrstama hrane zbog pretpostavke da su količine arsena u hrani vrlo male. U zemljama članicama EU proveden je monitoring praćenja arsena koji obuhvaća razdoblje 2016.–2018. Cilj monitoringa bio je prikupiti pouzdane podatke o učincima arsena koji se zatim mogu iskoristiti za ispravnu procjenu rizika kod postavljanja dodatnih maksimalnih razina za ostale vrste hrane poput riže, hrane za dojenčad, voćne sokove i nektare (101). Hackethal i sur. (102) su proveli prvo njemačko istraživanje cjelokupnih prehrambenih skupina gdje su ustanovljene najviše i prosječne razine arsena u skupini namirnica „riba, riblji proizvodi i plodovi mora”, „povrće i proizvodi od povrća”, „mahunarke, orašasti plodovi, uljarice i začini” te „prehrambeni proizvodi za mlade”. Ova studija nije uključivala SPK, ali glavna grupa hrane u njihovoj studiji je bila slična i usporediva s našom vrstom uzorka, tj. „kava, kakao, čaj i infuzije”.

Nikal je još jedan metal za kojeg trenutačno ne postoje MRO vrijednosti pa se ne može znati koja je točno maksimalno dozvoljena razina nikla u hrani. EFSA je 2015. godine sumirala rezultate raznih istraživanja (103, 104) kako bi utvrdila u kojim se koncentracijama nikal nalazi u hrani. Prema tom izvješću, najveće koncentracije nikla pronađene su u gljivama, kakau i proizvodima od kaka (> 10 mg/kg), zrnu graha (9,8

mg/kg), soji (5,2 mg/kg), proizvodima od soje (5,1 mg/kg), orasima (3,6 mg/kg), kikirikiju (2,8 mg/kg), žitaricama (2,3 mg/kg), heljdi (2,0 mg/kg) te zobi (1,8 mg/kg). Osim toga, nikal je pronađen i u pivu (30 µg/L) te u vinu (100 µg/L). EFSA je također dodala da su faktori koji utječu na koncentraciju nikla u hrani uvjeti rasta (utvrđene su puno veće koncentracije nikla na područjima zagađenog tla) te način pripreme hrane (utjecaj posuđa za kuhanje). U uzorku SPK, određene su količine nikla od $2,495 \pm 0,055$ mg/kg, ali kako za sada ne postoji maksimalno dopuštena količina nikla u hrani, ne može se utvrditi je li ta količina previsoka. Alternativa je koristiti maksimalnu granicu za nikal u prirodnim mineralnim vodama, a koja je regulirana u EU Direktivom Komisije 2003/40/EC (105). Ipak, prema izvještaju EFSA-e može se primijetiti da je nikal inače u hrani prisutan u visokim koncentracijama. Udio teških metala u SPK analiziran je u malom broju dostupnih znanstvenih radova, a dobiveni rezultati uglavnom se podudaraju s rezultatima ovog istraživanja (106-108).

4.2 Primjenjivost mikrovalne ekstrakcije u revalorizaciji srebrne pokožice kave

4.2.1 Udio i kvaliteta proteina u MAE ekstraktima

4.2.1.1 Udio ukupnih proteina u MAE ekstraktima

U Tablici 10 prikazane su koncentracije ukupnih proteina u ekstraktima SPK dobivenih postupkom MAE za različite kombinacije trajanja ekstrakcije (3-9 min) i snage mikrovalova (100-200 W).

Tablica 10. Udio proteina u MAE ekstraktima SPK dobivenim pod različitim uvjetima

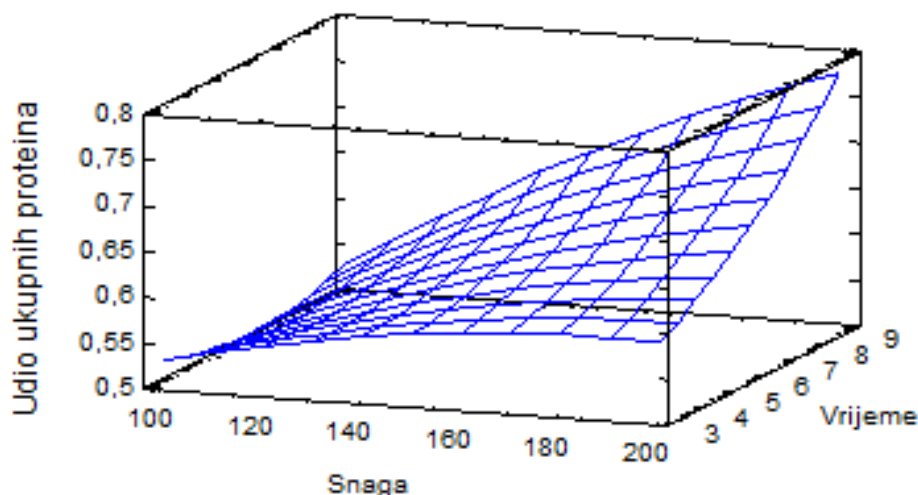
Oznaka uzorka	Vrijeme tretiranja [min]	Snaga [W]	Ukupni proteini [mg/L uzorka]
M1	6	100	$0,52 \pm 0,01$
M2	9	200	$0,77 \pm 0,07$
M3	9	100	$0,52 \pm 0,08$
M4	3	200	$0,59 \pm 0,01$
M5	6	200	$0,66 \pm 0,06$
M6	6	150	$0,59 \pm 0,16$
M7	9	150	$0,69 \pm 0,01$
M8	3	100	$0,53 \pm 0,00$
M9	3	150	$0,57 \pm 0,00$

Vrijednosti koncentracije ukupnih proteina se kreću u rasponu od $0,52 \pm 0,08$ mg/L do $0,77 \pm 0,07$ mg/L. Najveću vrijednost koncentracije ukupnih proteina ($0,77 \pm 0,07$ mg/L) ima uzorak M2 koji je tretiran 9 minuta, mikrovalovima snage 200 W. Takav rezultat je i dijelom očekivan jer se radi o uzorku koji je tretiran najdulje (9 minuta) i to najvećom primijenjenom snagom mikrovalova (200 W). Drugi najveći rezultat ($0,69 \pm 0,01$ mg/L) je pokazao uzorak M7, koji je tretiran snagom od 150 W u trajanju od 9 minuta. Sličnu vrijednost $0,66 \pm 0,06$ mg/L imao je uzorak M5 tretiran 6 minuta, snagom 200 W. Ostali uzorci pokazali su nešto niže vrijednosti koncentracije ukupnih proteina, raspona od $0,52 \pm 0,08$ mg/L do $0,59 \pm 0,16$ mg/L. Sva tri uzorka (M1, M3 i M8) tretirana snagom mikrovalova od 100 W pokazala su gotovo jednake koncentracije proteina od $0,52 \pm 0,08$ mg/L do $0,53 \pm 0,00$ mg/L. To pokazuje da se pri primjeni niske snage mikrovalova produljenjem trajanja ekstrakcije značajno ne povećava udio ekstrahiranih proteina. Analizom varijance (ANOVA) testiran je statistički značaj svakog faktora usporedbom srednje vrijednosti kvadrata s procjenom eksperimentalne pogreške. Iz Tablice 11 vidi se da tri čimbenika i to snaga mikrovalova (A), vrijeme ekstrakcije (B) i njihov međudnos (AB) imaju p-vrijednost $< 0,05$, što znači da ta tri čimbenika imaju značajan učinak na udio ukupnih proteina u ekstraktu. Vrijednost R-kvadrata iznosi 98,9 %, što znači da 98,9 % varijabilnosti rezultata koncentracije ukupnih proteina možemo objasniti ovako postavljenim eksperimentom.

Tablica 11. Analiza varijanci (ANOVA) za udio ukupnih proteina

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	P-vrijednost
A:Snaga	0,0345649	1	0,0345649	158,04	0,0011
B:Vrijeme	0,0139394	1	0,0139394	63,74	0,0041
AA	0,0007019	1	0,0007019	3,21	0,1711
AB	0,0089776	1	0,0089776	41,05	0,0077
BB	0,0008625	1	0,0008625	3,94	0,1412
Ukupna pogreška	0,0006561	3	0,0002187	/	/
Ukupna pogreška (ispravljeno)	0,0597024	8	/	/	/

Na Slici 20 dan je grafički prikaz statističke obrade dobivenih podataka kroz prikaz dijagrama odzivnih površina za koncentraciju ukupnih proteina. Vidljivo je da i snaga mikrovalova i vrijeme ekstrakcije imaju utjecaj na koncentraciju ukupnih proteina te da se najviše koncentracije ukupnih proteina postižu upravo pri najvećoj snazi mikrovalova i najduljem trajanju ekstrakcije.



Slika 20. 3D prikaz odzivne površine za koncentraciju ukupnih proteina

Statističkom obradom podataka dobivena je jednadžba eksperimentalnog modela koja omogućuje izračunavanje koncentracije ukupnih proteina s različitim vrijednostima snage mikrovalova i vremena ekstrakcije. Na temelju dobivenih podataka i provedene statističke analize dobivena je regresijska jednadžba eksperimentalnog modela za određivanje koncentracije ukupnih proteina (KUP) u ekstraktu SPK prema izrazu [6]:

$$KUP = 0,479206 + 0,001871 \times A - 0,0589972 \times B - 0,00000749333 \times A^2 + 0,000315833 \times A \times B + 0,00230741 \times B^2 \quad [6]$$

gdje je:

KUP-koncentracija ukupnih proteina;

A-snaga mikrovalova;

B-vrijeme ekstrakcije.

Predviđena promjena koncentracije ukupnih proteina kao funkcija promjene snage

mikrovalova i vremena ekstrakcije prikazana je u Tablici 12. Tablica prikazuje područje vrijednosti u kojoj se javlja najstrmiji uspon krivulje promjene koncentracije ukupnih proteina, odnosno područje u kojem se za najmanju promjenu faktora snage mikrovalova i vremena ekstrakcije najbrže mijenja koncentracija ukupnih proteina. To područje vrijednosti zanimljivo je za istraživanje prilikom potencijalnih budućih mjerenja, ako se malom promjenom uvjeta želi postići značajno povećanje ili smanjenje udjela proteina u dobivenom ekstraktu. Povećanjem snage i vremena ekstrakcije rasla je i koncentracija ukupnih proteina.

Tablica 12. Predviđena vrijednost koncentracije ukupnih proteina prema postavljenom modelu eksperimenta

Snaga (W)	Vrijeme (min)	Predviđeno
		Koncentracija ukupnih proteina (mg/L)
150,0	6,0	0,6045
151,0	6,0387	0,6067
152,0	6,0786	0,6089
153,0	6,1199	0,6111
154,0	6,1624	0,6134
155,0	6,2061	0,6157
160,0	6,3423	0,6212
170,0	6,6923	0,6485

Tablica 13 prikazuje rezultate optimizacije parametara ekstrakcije. Optimalna vrijednost koncentracije ukupnih proteina iznosi 0,7780 mg/L, a ona se postiže pri maksimalnoj snazi mikrovalova od 200 W i pri najduljem vremenu ekstrakcije od 9 minuta. Usporedbom predviđenih i dobivenih rezultata vidljivo je vrlo dobro podudaranje s dobivenim modelom.

Tablica 13. Prikaz rezultata optimizacije MAE za ukupne proteine

Faktor	Najviše	Najniže	Optimalno
Snaga (W)	100,0	200,0	200,0
Vrijeme (min)	3,0	9,0	9,0
Optimalna vrijednost:		0,7780 mg/L	
Vrijednost dobivena u optimalnim uvjetima:		0,7734 ± 0,07 mg/L	

4.2.1.2 Aminokiselinski sastav MAE ekstrakata

U proteinskim ekstraktima SPK s najvišim sadržajem proteina (M2: 9 min/200 W i M7: 9 min/150 W) određen je udio i sastav aminokiselina. Obradom dobivenih kromatograma izračunate su koncentracije pojedinih aminokiselina u analiziranim uzorcima i prikazane u Tablici 14. Iz prikazanih podataka vidljivo je da je najveća koncentracija aminokiselina Asx (539,66 i 533,02 pmol/μL) u oba uzorka. Asx označava zajedničku koncentraciju asparaginske kiseline (Asp) i asparagina (Asn), budući da se tijekom kiseline hidrolize proteina Asp djelomično konvertira do Asn te se ne mogu individualno kvantificirati. Sljedeća najzastupljenija aminokiselina u oba uzorka je prolin (Pro) s koncentracijama 485,60 pmol/μL u uzorku M2 i 488,52 pmol/μL u M7. Treću najvišu koncentraciju ima aminokiselina Glx, koja predstavlja zajedničku koncentraciju glutaminske kiseline (Glu) i glutamina (Gln), kod kojih dolazi do konverzije Glu do Gln. U oba uzorka (M2 i M7) sadržane su gotovo sve esencijalne aminokiseline, koje čine fenilalanin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, treonin, triptofan i valin. Jedina esencijalna aminokiselina koja nedostaje u ovoj analizi je triptofan (Trp), čija se koncentracija ne može odrediti ovom metodom jer tijekom hidrolize dolazi do njegove degradacije. Iz istog razloga ovom metodom je nemoguće odrediti i cistein. Zbog toga što sadrži sve esencijalne aminokiseline, SPK ima potencijal za korištenje u ljudskoj prehrani. Dobiveni rezultati uglavnom su u skladu s nedavnim istraživanjem kvalitete proteina SPK Wena i sur. (46).

Tablica 14. Prikaz koncentracija pojedinih aminokiselina u uzorcima M2 i M7

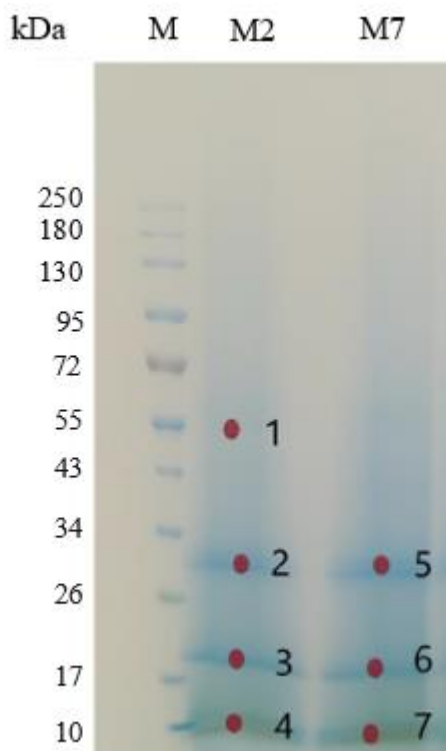
Aminokiselina	RT	M2 [$\mu\text{mol/L}$]	M7 [$\mu\text{mol/L}$]
Asx^a	12,45	539,66	533,02
Ser	14,05	155,81	153,29
Glx^a	14,75	403,39	440,91
Gly	16,15	404,64	394,97
His	16,69	36,65	36,94
Arg	20,42	113,05	111,93
Thr	21,17	93,89	96,76
Ala	22,47	212,70	209,15
Pro	24,63	485,60	488,52
Tyr	28,06	47,12	45,78
Val	29,09	116,85	117,78
Met	29,54	13,72	12,46
Lys	31,61	48,32	40,72
Ile	32,50	88,83	90,06
Leu	33,03	93,10	93,81
Phe	34,11	56,99	59,97

^a Tijekom kiseline hidrolize Asp se konvertira do Asn, a Glu do Gln stoga se ne mogu individualno kvantificirati. Stoga se Asp i Asn određuju zajedno te se označavaju kao Asx, a Glu i Gln kao Glx. *Tijekom hidrolize dolazi do degradacije triptofana i cisteina, stoga se te aminokiseline ovom metodom ne određuju. oznake aminokiselina: Ser – serin; Gly – glicin; His – histidin; Arg – arginin; Thr – treonin; Ala – alanin; Tyr – tirozin; Val – valin; Met – metionin; Lys – lizin; Ile- izoleucin; Leu – leucin; Phe – fenilalanin

4.2.1.3 Karakterizacija proteina/peptida u MAE ekstraktima

Kako je prethodno opisano, razdvajanje proteina s obzirom na njihovu veličinu provedeno je standardnom laboratorijskom tehnikom SDS-PAGE koja omogućava vizualizaciju i provjeru prisutnosti neželjenih proteinskih kontaminacija. Čisti proteinski uzorak obično pokazuje samo jednu traku na gelu, dok prisutnost kontaminanata rezultira višestrukim trakama. SDS-PAGE može razdvojiti i različite podjedinice proteinskog kompleksa. To je korisno za razumijevanje strukture i funkcije multimeričkih proteina.

Proteinske vrpce razdvojene SDS-PAGE metodom vidljive na Slici 21 i označene brojevima od 1 do 7 dalje su iskorištene za analizu veličine i identifikaciju proteina. Proteini su identificirani usporedbom dobivenih spektara s onima u bazi podataka UniProt (87).



Slika 21. SDS-PAGE gel standardnog proteina (M) i uzoraka M2 i M7

Iz slike je vidljivo da oba analizirana uzorka (M2 i M7) sadrže proteine slične mase. Nakon razdvajanja proteina SDS-PAGE metodom i njihove digestije u gelu, vrpce proteina izrezane su iz SDS-PAGE gela te je provedena analiza dobivenih peptida MALDI-TOF/TOF metodom.

Rezultati MALDI-TOF ili TOF/TOF analize prikazani su u Tablici 15 pri čemu je vidljivo da su u MAE ekstraktima definirani proteini mase u rasponu od 15,7 kDa do najviše 70,2 kDa. Protein čija je masa 15,7 kDa je karakteriziran kao protein koji sadrži Barwinovu domenu što ukazuje na mogućnost potencijalne primjene u smislu ciljanog dobivanja biološki aktivnih peptida (109).

Tablica 15. Lista identificiranih proteina/peptida u uzorcima SPK (MAE)

Linija na gelu	Pristupni broj*	M _w [kDa]	Vrednovanje pogotka**	Broj ident. peptida	Protein
1	A0A068TV85	48,9	416,1	7	Nekarakteriziran protein
2	A0A068V707	70,2	827,4	12	Nekarakteriziran protein
4	A0A068VGK6	15,7	244,5	6	Sadrži Barwin domenu
5	A0A068V707	70,2	599,5	9	Nekarakteriziran protein
7	A0A068VGK6	15,7	144,2	4	Sadrži Barwin domenu

*Pristupni broj u UniProt bazi podataka; **Vrijednosti iznad 35 se smatraju statistički značajne ($p < 0,05$)

4.2.2. Udio i kvaliteta polifenola u MAE ekstraktima srebrne pokožice kave

Polifenoli se zbog širokog spektra bioloških učinaka smatraju funkcionalno vrijednim sastavnicama hrane te bi njihova prisutnost u proteinskim ekstraktima SPK mogla biti važna za određene aspekte buduće primjene. Stoga je bilo važno utvrditi dolazi li tijekom ekstrakcije proteina iz SPK do koekstrakcije polifenolnih komponenti i, ako da, utječu li uvjeti MAE pogodni za ekstrakciju proteina na prinose ukupnih polifenola.

Rezultati određivanja udjela ukupnih polifenola u ekstraktima SPK dobivenih postupkom mikrovalne ekstrakcije pri različitim uvjetima vremena tretiranja i snage prikazani su u Tablici 16.

Tablica 16. Udio polifenola u ekstraktima SPK dobivenih postupkom mikrovalne ekstrakcije pri različitim vremenima tretiranja i snage

Oznaka uzorka	Vrijeme tretiranja [min]	Snaga [W]	Ukupni polifenoli [mg EGK/100 g]
M1	6	100	591,90± 0,10
M2	9	200	646,80 ± 0,06
M3	9	100	556,40 ± 0,04
M4	3	200	568,80 ± 0,02
M5	6	200	559,90 ± 0,15
M6	6	150	677,80 ± 0,03
M7	9	150	611,80 ± 0,11
M8	3	100	617,00 ± 0,09
M9	3	150	654,00 ± 0,06

*EGK – ekvivalenti galne kiseline

Analizom dobivenih ekstrakata utvrđeno je da tijekom ekstrakcije proteina dolazi do značajne koekstrakcije polifenolnih sastavnica. Vrijednosti udjela polifenola kretale su se u rasponu od 556,39 ± 0,04 mg EGK/100 g do 677,81 ± 0,03 mg EGK/100 g. Najveći maseni udio polifenola (677,81 ± 0,03 mg EGK/100 g) imao je uzorak M6 koji je tretiran 6 minuta mikrovalovima snage 150 W. To je neočekivan rezultat, budući da je očekivano da bi uzorak koji je tretiran najduže i s najvećom snagom (M2) trebao imati najveći udio (46). Međutim, uzorak M2 imao je maseni udio polifenola od 646,75 ± 0,06 mg EGK/100 g, što je tek treća po redu najveća dobivena vrijednost. Drugi najbolji rezultat pokazao je uzorak M9 (653,99 ± 0,06 mg EGK/100 g), koji je tretiran 3 minute snagom mikrovalova od 150 W. Najniži maseni udio polifenola imao je uzorak M3 (556,39 ± 0,04 mg EGK/100 g), koji je tretiran 9 minuta, najnižom snagom mikrovalova od 100 W. Ovakav rezultat je bio predvidljiv zbog najniže korištene snage mikrovalova, ali ne i zbog dugog vremena tretiranja. S druge strane, za uzorak M8 koji je tretiran najkraće (3 minute) s najnižom snagom mikrovalova (100 W), očekivao se najniži udio ukupnih polifenola, međutim dobiveni rezultat od 617,03 ± 0,09 mg EGK/100 g je bio četvrti po redu od najviših dobivenih udjela.

U Tablici 17 prikazani su rezultati provedene analize varijance na temelju koje se može zaključiti koji od promatranih parametara značajno utječu na udio polifenola u dobivenim ekstraktima. Za prinose polifenola niti jedan od ispitivanih faktora (snaga mikrovalova i vrijeme ekstrakcije) ne pokazuje statističku značajnost ($p > 0,05$). Ispitan je i utjecaj međuodnosa nezavisnih varijabli (AA, AB, BB), koji se također nije pokazao statistički značajnim ($p > 0,05$). Dobiveni rezultati vjerojatno su posljedica činjenice da je ekstrakcija provedena unutar raspona vrijednosti snage/temperature pogodnih za ekstrakciju proteina, a koji su puno blaži od uvjeta MAE koji su se u literaturi pokazali optimalnima (i značajnima) za ekstrakciju fenolnih komponenti iz sličnih kompleksnih matrica (110, 111).

Tablica 17. Analiza varijanci (ANOVA) za određivanje ukupnih polifenola

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost
A: Snaga	17,29410	1	17,2941	0,01	0,9139
B: Vrijeme	103,6140	1	103,6140	0,08	0,7923
AA	6666,3900	1	6666,3900	5,33	0,1042
AB	4798,6700	1	4798,6700	3,83	0,1451
BB	1,0247	1	1,0247	0,00	0,9790
Ukupna pogreška	3754,7200	3	1251,5700	/	/
Ukupna pogreška (ispravljeno)	15341,7000	8	/	/	/

4.3 Primjenjivost ultrazvučne ekstrakcije u revalorizaciji srebrne pokožice kave

4.3.1 Udio i kvaliteta proteina u UAE ekstraktima

4.3.1.1 Udio ukupnih proteina u UAE ekstraktima

U Tablici 18 prikazane su dobivene koncentracije ukupnih proteina u ekstraktima SPK dobivenim postupkom UAE za različite kombinacije trajanja ekstrakcije (3-9 min) i amplitude ultrazvučne probe (50-100 %).

Tablica 18. Rezultati mjerenja masenog udjela ukupnih proteina u uzorku SPK

Uzorak	Vrijeme [min]	Amplituda [%]	Ukupni proteini [mg/L uzorka]
U1	6	100	$0,87 \pm 0,06$
U2	6	75	$0,73 \pm 0,14$
U3	9	100	$0,87 \pm 0,09$
U4	9	50	$0,70 \pm 0,12$
U5	9	75	$0,62 \pm 0,05$
U6	3	75	$0,61 \pm 0,10$
U7	6	50	$0,51 \pm 0,12$
U8	3	100	$1,10 \pm 0,08$
U9	3	50	$0,66 \pm 0,10$

Iz prikazanih rezultata je vidljivo da je najveći maseni udio proteina određen u uzorku U8 ($1,10 \pm 0,08$ mg/L), a koji je tretiran ultrazvukom 3 minute i amplitudom 100 %. Nešto niže vrijednosti određene su u uzorcima U3 i U1 (redom $0,87 \pm 0,09$ mg/L i $0,87 \pm 0,06$ mg/L). Za sva tri uzorka s najvišim prinosima zajednička je amplituda (100 %) koja se pokazala najučinkovitijom u ekstrakciji proteina. Najniže vrijednosti masenog udjela proteina izmjerene su u uzorku U7 ($0,51 \pm 0,12$ mg/L) tretiranom 6 minuta, amplitudom 50 %.

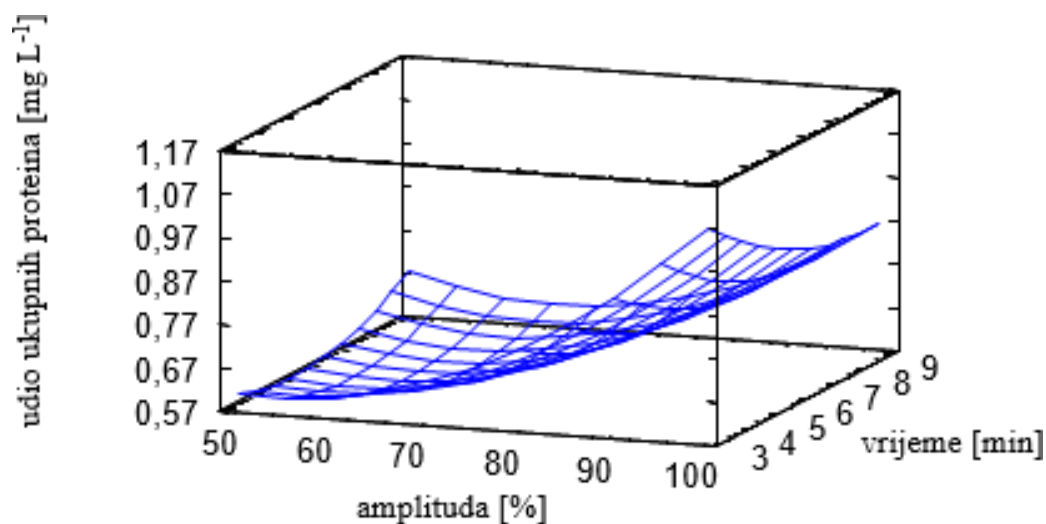
Iz rezultata dobivenih analizom varijance (Tablica 19) gdje se testira statistička značajnost svakog faktora usporedbom srednjeg kvadrata s procjenom eksperimentalne pogreške, utvrđeno je da značajan statistički učinak na udio ukupnih proteina ($p < 0,05$) ima

amplituda. Stoga, prilikom optimizacije parametara UAE treba pažljivo prilagoditi postotak amplitude kako bi se postigli optimalni rezultati ekstrakcije.

Tablica 19. Statistički značajne varijable za udio ukupnih proteina

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F- omjer	p-vrijednost
A: amplituda	0,154465	1	0,154465	13,02	0,0365
B: vrijeme	0,005098	1	0,005098	0,43	0,5589
AA	0,034278	1	0,034278	2,89	0,1877
AB	0,018796	1	0,018796	1,58	0,2972
BB	0,006164	1	0,006164	0,52	0,5231
Ukupna pogreška	0,03559	3	0,011863	-	-

Grafički prikaz 3D dijagrama (Slika 22) predstavlja hipotetski model kojim će se mijenjati udio ukupnih proteina promjenom vrijednosti amplitude i vremena tretiranja. Model je kreiran nakon što smo spoznali kako najznačajniji učinak ima vrijednost amplitude tijekom ekstrakcije. Uz pomoć njega je moguće lakše manipulirati procesom ako želimo malom promjenom uvjeta ekstrakcije značajno povećati ili smanjiti udio proteina u ekstraktu.



Slika 22. 3D prikaz odzivne površine za udio ukupnih proteina

Rezultati optimizacije provedene pokazuju da nije potrebno tretirati uzorke duže od 3 minute, jer vrijeme nema statistički značajan utjecaj na udio proteina. Ovakvi podaci vrlo su važni za povećanje održivosti tehnoloških procesa jer omogućuju smanjenje potrošnje resursa, a da se pri tome i dalje postižu najbolji rezultati. Provedbom statističke analize dobivena je regresijska jednadžba (polinom optimizacije) eksperimentalnog modela [7] prilagođena eksperimentalno dobivenim podacima:

$$\begin{aligned} \text{Udio ukupnih proteina} = & 1,18532 - 0,019518 \times A - 0,0151889 \times B \\ & + 0,000209467 \times A^2 - 0,000914 \times A \times B + 0,00616852 \times B^2 \end{aligned} \quad [7]$$

gdje su:

A-amplituda ultrazvučne probe; B-vrijeme ekstrakcije.

Predviđena promjena koncentracije ukupnih proteina s promjenom amplitude probe i vremena ekstrakcije prikazana je u Tablici 20. Tablica prikazuje područje vrijednosti u kojoj se javlja najstrmiji uspon krivulje promjene koncentracije ukupnih proteina, odnosno područje u kojem se za najmanju promjenu faktora snage mikrovalova i vremena ekstrakcije najbrže mijenja koncentracija ukupnih proteina. To područje vrijednosti zanimljivo je za istraživanje prilikom potencijalnih budućih mjerenja, ako se malom promjenom uvjeta želi postići značajno povećanje ili smanjenje udjela proteina u dobivenom ekstraktu. Rezultati pokazuju da se primjenom amplitude 100,00 % i vremena od 9 minuta postižu optimalne vrijednosti udjela proteina (0,87 mg/L). Visina amplitude u pojedinačnim analizama ipak ima značajan utjecaj na udio proteina. Stoga to treba uzeti u obzir prilikom dizajniranja UAE da se smanji nepotrebno trošenje energije.

Tablica 20. Predviđena vrijednost koncentracije ukupnih proteina prema postavljenom modelu eksperimenta

<i>Faktor</i>	<i>Najniža</i>	<i>Najviša</i>	<i>Optimalno</i>
Amplituda (%)	50,0	100,0	100,00
Vrijeme (min)	3,0	9,0	9,0
Optimalna vrijednost:		1,06 mg/L	
Vrijednost dobivena u optimalnim uvjetima		0,87 ± 0,09 mg/L	

4.3.1.2 Aminokiselinski sastav UAE ekstrakata

Iz podataka prikazanih u Tablici 21 vidljivo je da je najveća koncentracija aminokiselina Asx (539,03 i 577,53 $\mu\text{mol/L}$) u oba uzorka. Asx označava zajedničku koncentraciju asparaginske kiseline (Asp) i asparagina (Asn), budući da se tijekom kiselinske hidrolize proteina Asp djelomično konvertira do Asn te se ne mogu individualno kvantificirati. Sljedeća najzastupljenija aminokiselina u oba uzorka je prolin (Pro) sa koncentracijama 486,73 $\mu\text{mol/L}$ u uzorku U6 i 523,03 $\mu\text{mol/L}$ u uzorku U8.

Treću najvišu koncentraciju ima aminokiselina Glx koja predstavlja zajedničku koncentraciju glutaminske kiseline (Glu) i glutamina (Gln), kod kojih dolazi do konverzije Glu do Gln. Nakon toga prema zastupljenosti u nizu je aminokiselina Gly, a to je građom najjednostavnija aminokiselina. U oba uzorka (U2 i U8) sadržane su gotovo sve esencijalne aminokiseline. Nedostaje podatak za treonin (Thr) kojeg nije bilo moguće izmjeriti ovom metodom jer tijekom analitičkog postupka dolazi do njene degradacije.

Dobiveni rezultati ukazuju na visoku nutritivnu vrijednost proteina SPK te veliki potencijal primjene u ljudskoj prehrani. Koncentracije aminokiselina u oba uzorka se minimalno razlikuju, ali koncentracije svih aminokiselina su nešto više u uzorku U8 jer taj uzorak sadrži veći maseni udio ukupnih proteina ($1,10 \pm 0,08 \text{ mg/L}$) u odnosu na uzorak U6 ($0,61 \pm 0,10 \text{ mg/L}$). Dobiveni rezultati uglavnom su usporedivi s rezultatima Wen i suradnika (46) te Zangh i suradnika (76).

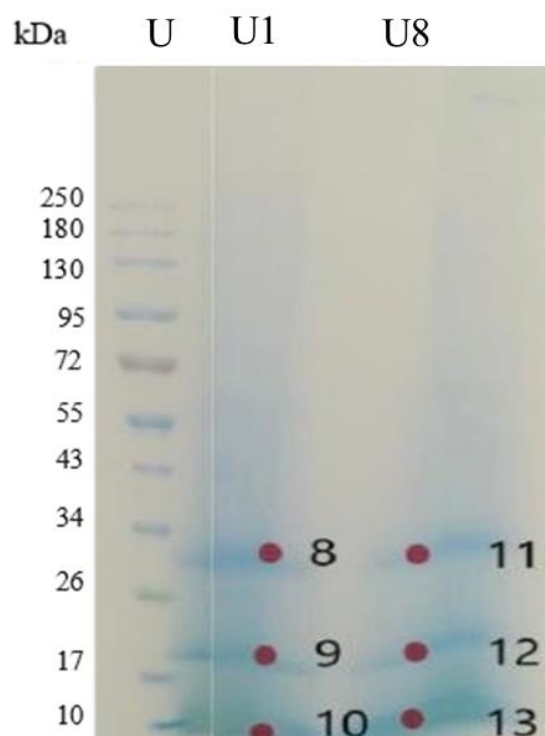
Tablica 21. Prikaz koncentracija pojedinih aminokiselina u uzorcima s najvećim prinosom proteina nakon UAE (U6 i U8)

Aminokiselina	RT	U6 [μmol/L]	U8 [μmol/L]
Asx *	12,45	539,03	577,53
Ser	14,05	148,91	163,49
Glx *	14,75	423,38	454,45
Gly	16,15	382,67	412,37
His	16,69	34,22	38,87
Arg	20,42	110,81	121,82
Thr	21,17	92,49	100,72
Ala	22,47	206,32	226,69
Pro	24,63	486,73	523,03
Tyr	28,06	41,72	46,99
Val	29,09	110,71	125,81
Met	29,54	12,08	14,12
Lys	31,61	44,60	48,98
Ile	32,50	82,36	94,52
Leu	33,03	85,17	98,27
Phe	34,11	52,33	60,83

*Tijekom kiselinske hidrolize Asp se konvertira do Asn, a Glu do Gln stoga se ne mogu individualno kvantificirati. Stoga se Asp i Asn određuju zajedno te se označavaju kao Asx, a Glu i Gln kao Glx. Tijekom hidrolize dolazi do degradacije triptofana i cisteina, stoga se te aminokiseline ovom metodom ne određuju.

4.3.1.3 Karakterizacija proteina/peptida u UAE ekstraktima

Karakterizacija proteina u SPK ekstraktima dobivenim primjenom UAE provedena je na isti način kako je prethodno opisano za MAE. Za analizu su odabrana dva uzorka s najvećim prinosima proteina (U1 i U8). Na Slici 23 vidljivo je da oba uzorka sadrže proteine slične mase.



Slika 23. SDS-PAGE gel uzoraka U1 i U8 (U-standardi)

Rezultati MALDI-TOF ili TOF/TOF analize prikazani su u Tablici 22 na isti način kao kod podataka za MAE, a pri čemu je vidljivo da je najveća masa proteina 70,2 kDa, a najniža 15,7 kDa. Kao i u slučaju MAE, utvrđeno je da protein čija je masa 15,7 sadrži Barwinovu domenu. Osim proteina s Barwinom domenom prisutan je i drugi ustanovljeni protein koji nema specifične karakteristike, osim velike mase.

Tablica 22. Lista identificiranih proteina/peptida u uzorcima SPK (UAE)

Linija na gelu	Pristupni broj*	M _w [kDa]	Vrednovanje pogotka**	Broj ident. peptida	Protein
8	A0A068V707	70,2	322,6	6	Nekarakterističan
10	A0A068VGK6	15,7	144,2	4	Sadrži Barwinovu domenu
11	A0A068V707	70,2	851,3	15	Nekarakterističan
13	A0A068VGK6	15,7	144,2	4	Sadrži Barwinovu domenu

*Pristupni broj u UniProt bazi podataka; **Vrijednosti iznad 35 se smatraju statistički značajne (p<0,05)

4.3.2 Udio i kvaliteta polifenola u UAE ekstraktima srebrne pokožice kave

Kao što je prethodno objašnjeno, zbog poželjne prisutnosti polifenola u ekstraktima SPK, jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je utvrditi dolazi li tijekom ekstrakcije proteina iz SPK do koekstrakcije polifenolnih komponenti i, ako da, utječu li uvjeti UAE pogodni za ekstrakciju proteina na prinose ukupnih polifenola. Rezultati određivanja udjela ukupnih polifenola u ekstraktima SPK dobivenih postupkom mikrovalne ekstrakcije pri različitim uvjetima vremena tretiranja i snage prikazani su u Tablici 23.

Maseni udio ukupnih polifenola u uzorku SPK se kretao u rasponu od $375,57 \pm 0,05$ mg EGK/100 g do $525,67 \pm 0,03$ mg EGK/100 g. Uzorak U5 koji je tretiran 9 minuta i amplitudom od 75 % pokazao je najveći maseni udio ukupnih polifenola ($525,67 \pm 0,03$ mg EGK/100 g). Nešto nižu vrijednost udjela ukupnih polifenola pokazao je uzorak U1 tretiran 6 minuta i amplitudom 100 % ($483,93 \pm 0,03$ mg EGK/100 g), uzorak U3 je pokazao nižu vrijednost od očekivanog. S obzirom da je tretiran najvišom amplitudom i najdužim vremenom pretpostavljalo se da će pokazati najvišu vrijednost udjela ukupnih polifenola. Međutim, uzorak je tek treći u nizu ($456,85 \pm 0,03$ mg EGK/100 g). Ipak je očekivano najniža izmjerena vrijednost bila kod uzorka U9 koji je podvrgnut tretmanu od 3 minute i amplitudi 50 % ($375,57 \pm 0,05$ mg EGK/100 g). Niža vrijednost masenih udjela polifenola uzoraka je rezultat lošeg odabira otapala. Istraživanja su pokazala kako je voda najlošije otapalo za ekstrakciju polifenola (112).

Tablica 23. Rezultati mjerenja masenog udjela ukupnih polifenola u uzorku SPK

Uzorak	Vrijeme [min]	Amplituda [%]	Ukupni polifenoli [mg EGK/100 g]
U1	6	100	483,90 ± 0,03
U2	6	75	436,50 ± 0,03
U3	9	100	456,90 ± 0,03
U4	9	50	413,20 ± 0,09
U5	9	75	525,70 ± 0,03
U6	3	75	397,70 ± 0,06
U7	6	50	387,00 ± 0,03
U8	3	100	434,30 ± 0,05
U9	3	50	375,60 ± 0,05

*EGK-ekvivalenti galne kiseline

Tablica analize varijanci (ANOVA) prikazuje varijabilnost udjela ukupnih polifenola za svaki od faktora. Rezultati analize varijanci za udio ukupnih polifenola u Tablici 24 pokazuju kako promjena visine amplitude i vremenskog intervala kao ni njihova kombinacija nemaju značajan utjecaj na udio ukupnih polifenola ($p>0,05$).

Tablica 24. Analiza varijanci za udio ukupnih polifenola

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F- omjer	p-vrijednost
A: amplituda	6623,80	1	6623,80	4,30	0,13
B: vrijeme	5899,76	1	5899,76	3,83	0,15
AA	1584,21	1	1584,21	1,03	0,38
AB	57,21	1	57,21	0,04	0,86
BB	7,22	1	7,22	0,00	0,95
Ukupna pogreška	4626,57	3	1542,19	-	-
Ukupna korelacija	18798,80	8	-	-	-

4.4 Analiza životnih ciklusa

4.4.1 GWP ekstrakcije proteina iz srebrne pokožice kave

GWP se standardno definira kao umnožak potrošnje energije (kWh) i emisijskog faktora (kg CO₂/kWh) pa zato nema specifičnu mjeru u konvencionalnim jedinicama. Predstavlja omjer koji izražava koliko topline određeni plin može „zarobiti“ u atmosferi u odnosu na ekvivalentnu masu ugljičnog dioksida (CO₂). Stoga se GWP mjeri u odnosu na kilograme ekvivalenta ugljičnog dioksida (kg CO₂e).

Procjena utroška energije, vode, struje i obrade materijala je ključna za točan izračun GWP postupka procesiranja SPK. Korištenjem stvarnih podataka, za svaki od ovih čimbenika može se dobiti precizniji izračun, što pomaže u identificiranju područja gdje se mogu napraviti poboljšanja s ciljem smanjenja ukupnog ugljičnog otiska. Kompanija Franck d.d., čiji su uzorci SPK u ovom radu analizirani, javno je objavila sumarne tehnološke podatke u svojem godišnjem izvještaju (zadnji iz 2022.) (113), a koji su onda korišteni za izračun GWP (64, 70). Iz analize dostupnih izvještaja razvidno je da apsolutna potrošnja električne energije poduzeća raste u odnosu na prethodne godine što posljedično utječe i na povećanje GWP-a različitih procesa (a tako i dobivanja SPK), iako se korelacija mora utvrditi izračunima. Promjene u potrošnji energenata ovisile su u najvećoj mjeri o širenju

poslovanja i povećanju proizvodnih kapaciteta, a što se posljedično odrazilo i na potrošnju električne energije. Potrošnja topline odnosi se na potrebe za rad pogona (linija za prženje kave i kavovina) i grijanje te podrazumijeva potrošnju prirodnog plina i pare. Dio potrošnje topline koji se odnosi na procese proizvodnje proporcionalan je količini prerađene kave, dok je drugi aspekt ovisan o vanjskim vremenskim uvjetima.

U okviru ovog istraživanja najprije je analiziran je GWP dobivanja proteinskih ekstrakata iz SPK postupkom MAE i UAE za različite kombinacije vremena ekstrakcije i snage mikrovalova/amplitude ultrazvučne sonde, a nakon toga su za prihvatljive ekstrakcijske uvjete (zadovoljavajući prinos i što manji GWP) napravljene simulacije GWP procesa na industrijskoj razini koje uzimaju u obzir čitav životni ciklus proizvoda (114, 115), uključujući i zbrinjavanje otpada.

Vrijednosti GWP za proteinske ekstrakte SPK dobivene postupkom MAE ovisno o različitim uvjetima prikazani su, od najmanjeg prema najvećem, u Tablici 25.

Tablica 25. Rezultati izračuna GWP za proteinske ekstrakte SPK (MAE)

Redni broj uzorka	Ukupni proteini (prinos) [mg/L]	Energija [kWh]	Vrijeme [min]	GWP [g CO _{2e} / ciklusu]
M8	0,53	5	3	2,59
M9	0,57	3	3	3,89
M1	0,52	10	6	5,18
M4	0,59	10	3	5,18
M3	0,52	15	9	7,78
M6	0,59	15	6	7,78
M5	0,66	20	6	10,37
M7	0,69	22,5	9	11,67
M2	0,77	30	9	15,55

Vrijednosti GWP kretale su se od 2,59 g CO_{2e}/ciklusu (uzorak M8) do čak 15,55 g CO_{2e}/ciklusu. Vrijednosti GWP očekivano su korelirale s utroškom energije u pojedinom

ciklusu (Pearson $r = 0,8257$) te GWP vrijednostima (Pearson $r = 0,8894$).

Potrošnju energije za provedbu UAE moguće je izračunati ako su poznati amplituda (izražena kao postotak), vrijeme (u minutama) i snaga uređaja (u vatima) te zatim na temelju emisijskog faktora energije izračunati emisiju CO₂. Podaci za snagu kod UAE su navedeni u Tablici 26 te je prema njima izračunata prilagođena snaga.

Tablica 26. Prosječne vrijednosti parametara praćenih tijekom izvođenja UAE

Uzorak	Vrijeme [min]	Amplituda [%]	Temperatura [°C]	Snaga [W]	Energija [J]	dT	Ukupna promjena [J s ⁻¹]*
U1	6	100	18,04 ± 0,24	68,24 ± 0,28	14256,51 ± 0,51	1,00 ± 0,83	4,37 ± 0,27
U2	6	75	18,54 ± 0,17	61,85 ± 0,11	12235,22 ± 0,53	0,92 ± 1,59	4,08 ± 0,57
U3	9	100	20,19 ± 0,32	63,68 ± 0,32	19447,38 ± 0,49	1,19 ± 1,29	5,49 ± 0,34
U4	9	50	17,11 ± 0,14	48,04 ± 0,08	13727,16 ± 0,56	0,82 ± 1,93	3,23 ± 0,81
U5	9	75	19,85 ± 0,36	60,74 ± 0,18	18151,54 ± 0,53	1,82 ± 1,34	9,04 ± 0,29
U6	3	75	22,38 ± 0,12	69,58 ± 0,02	6585,21 ± 0,55	1,00 ± 1,32	5,02 ± 0,41
U7	6	50	21,64 ± 0,16	49,75 ± 0,05	9401,94 ± 0,55	0,82 ± 2,10	4,49 ± 0,56
U8	3	100	25,88 ± 0,10	85,17 ± 0,03	8203,71 ± 0,53	1,21 ± 0,76	4,27 ± 0,27
U9	3	50	20,64 ± 0,09	50,72 ± 0,03	4890,22 ± 0,53	0,31 ± 1,69	2,12 ± 0,34

* masa uzorka iznosi 110 g, a specifični toplinski kapacitet uzorka iznosi 1,5114 J K⁻¹ g⁻¹

Uz preračunavanje Emisijskog faktora koji iznosi 0,51848 kg CO₂ / kWh, može se izračunati emisija CO₂ (kg) na isti način kao i kod mikrovalne ekstrakcije.

Vrijednosti GWP za proteinske ekstrakte SPK dobivene postupkom UAE ovisno o različitim uvjetima prikazani su, od najmanjeg prema najvećem, u Tablici 27.

Tablica 27. Rezultati izračuna GWP za proteinske ekstrakte SPK (UAE)

Redni broj uzorka	Ukupni proteini (prinos) [mg/L]	Energija [kWh]	Vrijeme [min]	GWP [g CO ₂ e / ciklusu]
U9	0,66	1,35 x 10 ⁻³	3	1,31
U6	0,61	1,83 x 10 ⁻³	3	1,80
U8	1,10	2,28 x 10 ⁻³	3	2,21
U7	0,51	2,61 x 10 ⁻³	6	2,58
U2	0,73	3,40 x 10 ⁻³	6	3,21
U1	0,87	3,96 x 10 ⁻³	6	3,54
U4	0,70	3,81 x 10 ⁻³	9	3,74
U5	0,62	5,04 x 10 ⁻³	9	4,72
U3	0,87	5,40 x 10⁻³	9	4,95

Iz navedenih podataka vidljivo je da najveći potencijal globalnog zatopljenja ima uzorak U3 s GWP od 4,95 g CO₂e, odnosno da porastom vremena tretiranja uzorka dolazi do povećanja istog, uz linearno povećanje amplitude. Međutim, povećanje je intenzivnije povećanjem vremena. Za razliku od ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, u slučaju UAE nije utvrđena korelacija prinosa proteina s utroškom energije odnosno GWP-om.

4.4.2 GWP proteinskih ekstrakta srebrne pokožice kave dobivenih optimiziranim procesom ultrazvučne ekstrakcije

Na temelju optimizacije ekstrakcijskih postupaka i provedene LCA na laboratorijskoj razini utvrđeno je da je UAE prihvatljivija za dobivanje proteinskih ekstrakata i u smislu prinosa i ukupnog GWP ekstrakcijskog procesa. Stoga je korištenjem prethodno dobivenih podataka o GWP jednog UAE ciklusa izračunat ukupni GWP proteinskog ekstrakta SPK dobivenog procesom UAE, a izraženo po kg nastalog otpada i to u 2 scenarija – bacanja otpada koji zaostaje nakon ekstrakcije na odlagalište ili njegovim biokompostiranjem.

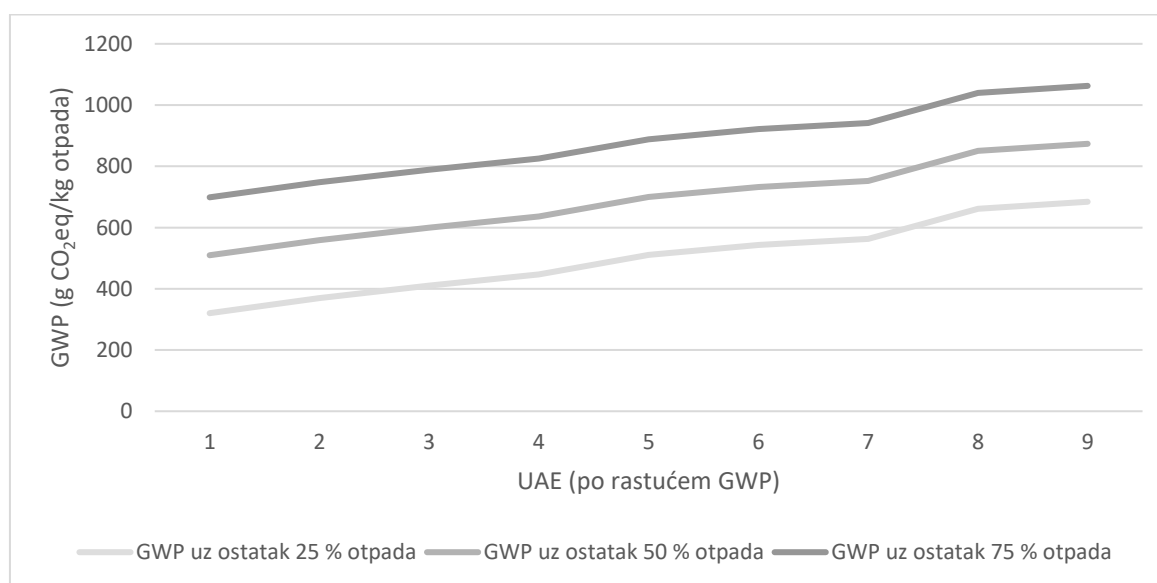
Rezultati pokazuju da GWP ekstrakcijskog postupka za uzorke SPK U1-U9 iznosi 1,31 – 4,95 g CO₂e/uzorku odnosno 131 – 495 g CO₂e/kg otpada (uz pretpostavku da je prosječna količina otpada koji zaostaje nakon ciklusa ekstrakcije oko 50 %, a što je utvrđeno tijekom laboratorijskih pokusa).

Izračun ukupnog GWP proteinskog ekstrakta dobiven je uzimajući u obzir čitav životni ciklus proizvoda pri čemu se otpad koji zaostaje nakon ekstrakcijskog procesa odlaže na odlagalište i temeljio se na dostupnim literaturnim podacima (116) te je procijenjen za tri scenarija (s obzirom na količinu otpada zaostalog nakon ekstrakcijskog procesa).

Tablica 28. Rezultati izračuna GWP proteinskog ekstrakta SPK dobivenog procesom UAE, u različitim scenarijima nastale količine otpada koja se odlaže na odlagalište.

Redni broj uzorka	GWP [g CO ₂ e / kg otpada] uz ostatak 25 % otpada	GWP [g CO ₂ e / kg otpada] uz ostatak 50 % otpada	GWP [g CO ₂ e / kg otpada] uz ostatak 75 % otpada
U9	320,24	509,50	698,71
U6	369,24	558,50	747,71
U8	410,24	599,50	788,71
U7	447,24	636,50	825,71
U2	510,24	699,50	887,71
U1	543,24	732,50	921,71
U4	563,24	752,50	941,71
U5	661,24	850,50	1039,71
U3	684,24	873,50	1062,71

S obzirom na dobivene rezultate grafički se može prikazati kako GWP gotovo linearno raste s povećanjem ostatka postotka otpada, prema Slici 24 (GWP uzoraka su aritmetički poredani po rastućim vrijednostima).



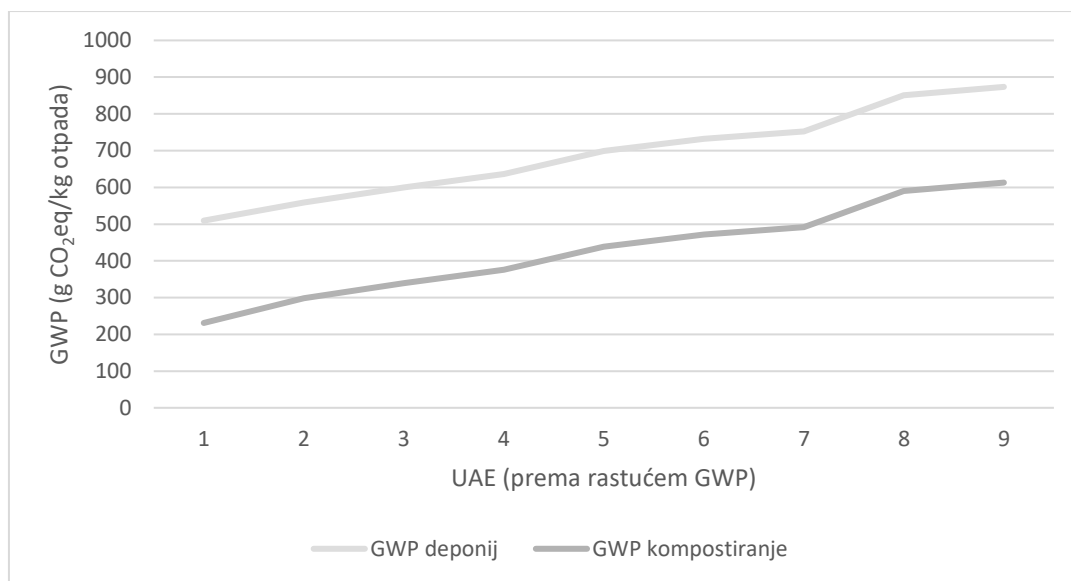
Slika 24. Prikaz ovisnosti GWP uz variranje otpadne SPK

Kako je vidljivo iz prikazanih podataka, GWP konačnog proizvoda značajno varira s obzirom na količinu nastalog otpada. Najvažniji čimbenik koji pridonosi stvaranju stakleničkih plinova u tom smislu je količina metana koja nastaje tijekom nekontrolirane razgradnje otpada po odlaganju na deponij otpada. Zbog toga je istraženo može li se kompostiranjem nastalog otpada postići značajno smanjenje emisija metana (i posljedično GWP) u odnosu na odlaganje. Dobiveni rezultati GWP proteinskog ekstrakta SPK dobivenog postupkom UAE u dva scenarija - odlaganja otpada na deponij i njegovog kompostiranja (pod pretpostavkom da nakon procesa ekstrakcije 50 % SPK zaostaje kao otpad) prikazana su u Tablici 29.

Tablica 29. Usporedba GWP proteinskog ekstrakta SPK dobivenog postupkom UAE u dva scenarija – odlaganje otpada i kompostiranje otpada.

Redni broj uzorka	GWP / kg otpada (deponij)	GWP / kg otpada (kompostiranje)
U9	509,50	231
U6	558,50	298
U8	599,50	339
U7	636,50	376
U2	699,50	439
U1	732,50	472
U4	752,50	492
U5	850,50	590
U3	873,50	613

Uspoređujući prikazane rezultate može se primijetiti iz grafičkog prikaza kako je GWP gotovo dvostruko manji u situaciji kada se otpad kompostira, a prema Slici 25.



Slika 25. Usporedni prikaz rasta GWP deponij VS kompostiranje

5. RASPRAVA

5.1 Zdravstvena ispravnost srebrne pokožice kave

Zdravstvena ispravnost SPK vrlo je važna u kontekstu procjene primjenjivosti ovog nusproizvoda u prehrambenoj ili farmaceutskoj industriji. Dostupna znanstvena istraživanja su malobrojna, a pokazuju da SPK može sadržavati ostatke teških metala, kao što su olovo, živa i kadmij, ali da se oni u SPK općenito nalaze u niskim koncentracijama - živa i kadmij otkriveni su u koncentracijama od 0,05 mg/kg i 0,07 mg/kg (117). Prema dostupnim podacima, prisutnost ostataka pesticida također je minimalna, te se procjenjuje da ne predstavlja značajan zdravstveni rizik. U ovom istraživanju u uzorcima SPK detektirana su tri pesticida - flutriafol u koncentraciji od $0,012 \pm 0,002$ mg/kg, imidakloprid u koncentraciji od $0,016 \pm 0,002$ mg/kg i piperonil butoksid u koncentraciji od $0,002 \pm 0,000$ mg/kg. Svi pesticidi nalaze se ispod granice maksimalno dopuštenih ostataka pesticida u hrani i ne predstavljaju rizik za ljudsko zdravlje. U uzorku SPK detektirana su i četiri teška metala, u najvećoj koncentraciji nikal ($2,495 \pm 0,055$ mg/kg), a zatim olovo ($0,249 \pm 0,077$ mg/kg), arsen ($0,107 \pm 0,018$ mg/kg) i kadmij ($0,106 \pm 0,002$ mg/kg). Prema spomenutoj Uredbi Komisije br. 1881/2006 olovo i kadmij se nalaze u koncentracijama koje ne prelaze maksimalno dopuštene količine kontaminanata u hrani, te stoga ne predstavljaju rizik za ljudsko zdravlje. Količina arsena u SPK detektirana je u niskim koncentracijama, a zbog niskih koncentracija u većini hrane, u Uredbu 1881/2006 još uvijek nisu uvedene maksimalno dopuštene količine za arsen u prehrambenim proizvodima. Nikal je prema izvješću EFSA-e detektiran i u mnogim drugim prehrambenim proizvodima i to u koncentracijama puno većim od 2,495 mg/kg koliko se nalazi u analiziranom uzorku SPK, no bez obzira na to nisu uvedene maksimalno dopuštene količine nikla u prehrambenim proizvodima. Dobiveni rezultati uglavnom su u skladu sa sličnim istraživanjima drugih autora. Bellestros i suradnici (106) su dokazali da SPK sadrži 1,64 mg/kg nikla, <1,60 mg/kg olova i <0,15 mg/kg kadmija. Rezultati tog rada slažu se s rezultatima količine olova i kadmija koji su dobiveni analizom SPK u ovom istraživanju, jedina razlika je što je u ovom radu nikal pronađen u nešto većim koncentracijama. I u drugim istraživanjima (107) utvrđene su iste količine arsena i kadmija te slične količine olova i nikla. Također su u tom istraživanju pronađene manje količine nikla i olova, dok je kadmija bilo nešto više. Najviša količina nikla ($3,17 \pm 0,23$ mg/kg) pronađena je u istraživanju miješanog uzorka SPK koje su proveli Martuscelli i sur. (108). Sve su te razlike vjerojatno bile povezane sa sastavom miješanih uzoraka SPK (% pojedine sorte), načinom uzgoja bilja (zemlja, voda, korištena

gnojiva i pesticidi) te u zavisnosti od uvjeta proizvodnje kave (korištene mješavine kave i temperature prženja), ostalih biljnih sekundarnih spojeva i kontaminanata.

Općenito, na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je SPK prihvatljiva za korištenje kao sekundarna sirovina u proizvodnji novih prehrambenih proizvoda ili dodataka prehrani.

5.2 Valorizacija srebrne pokožice kave kao sekundarne sirovine za dobivanje proteina – usporedba MAE i UAE

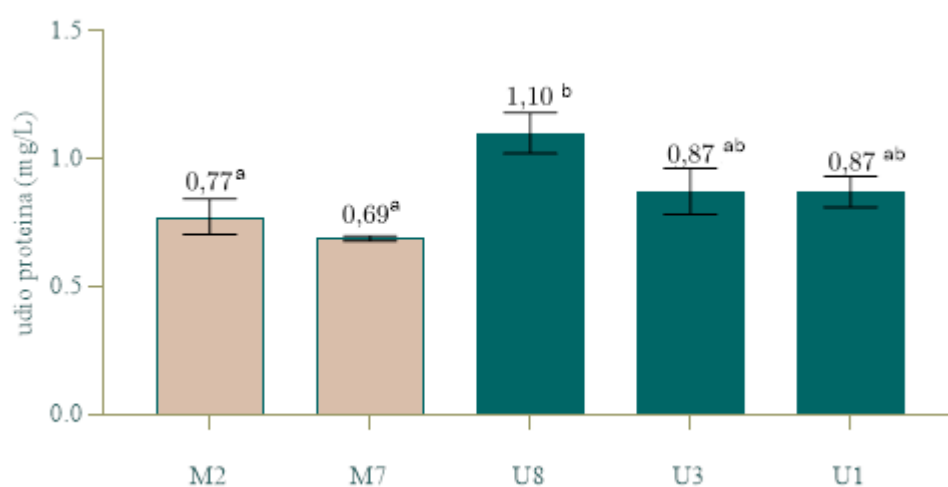
Istraživanje alternativnih izvora proteina za ljudsku prehranu sve je važnije u kontekstu neodrživosti i nefunkcionalnosti postojećeg sustava opskrbe hranom. Uzimajući u obzir rast globalne populacije koja će do 2050. godine dosegnuti gotovo 10 milijardi ljudi jasno je da će tradicionalni izvori životinjskih proteina postati nedostatni osobito uzimajući u obzir velik ekološki otisak uzgoja stoke te nužnost drastičnog smanjenja emisija stakleničkih plinova do 2050. Upravo iz tog razloga, uvođenje alternativnih izvora proteina predstavlja logičan i nužan korak kojim se smanjuje utjecaj na okoliš, a istodobno osigurava dostupnost kvalitetnih proteina. Osim toga, ovakve alternative mogu pomoći u rješavanju pothranjenosti, osobito u ranjivim populacijama gdje je pristup visokokvalitetnim proteinima ograničen. Povećavanjem raznolikosti izvora proteina povećava se otpornost prehrane, promiču održive poljoprivredne prakse i poboljšavaju sveukupni ishodi javnog zdravlja.

Nastojanja pronalazaka alternativnih, a održivih izvora proteina sve se više usmjeravaju na otpad i poljoprivrede i prehrambene industrije. Recentna istraživanja pokazuju da pretvaranje organskog otpada, uključujući poljoprivredne ostatke i nusproizvode prehrambene industrije, u proteine može značajno doprinijeti rješavanju pothranjenosti i smanjenju utjecaja na okoliš. Takav pristup objedinjuje zadovoljavanje adekvatne dostupnosti esencijalnog nutrijenta i valorizaciju tokova otpada čime se smanjuje rasipanje hrane i održivost sustava proizvodnje hrane (107).

SPK je tek nedavno prepoznata kao potencijalan izvor nutritivno vrijednih sastavnica, uključujući i proteine. Malobrojna istraživanja pokazuju da, ovisno o metodi prerade kave, SPK može sadržavati 12-19 % proteina što je čini perspektivnom sekundarnom sirovinom u tom smislu te pogodnom za daljnja istraživanja. U okviru ovog istraživanja po prvi puta je istražen i uspoređen utjecaj dva zelena ekstrakcijska postupka, UAE i MAE, na prinos i

kvalitetu proteinskih ekstrakata SPK.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je UAE prihvatljivija tehnika za dobivanje proteina iz SPK. Naime, iako i UAE i MAE omogućuju ekstrakciju proteina korištenjem vode kao otapala te u puno kraćem vremenu (3-9 min) u odnosu na klasične tehnike ekstrakcije otapalom koje uobičajeno traju oko 24 sata (46), prinosi dobiveni procesom UAE značajno su veći (Slika 26). Moguća je samo parcijalna usporedba dobivenih podataka s postojećim literaturnim podacima s obzirom da, prema trenutačnim saznanjima, ne postoji istraživanje mogućnosti ekstrakcije proteina vodom kao ekstrakcijskim sredstvom.



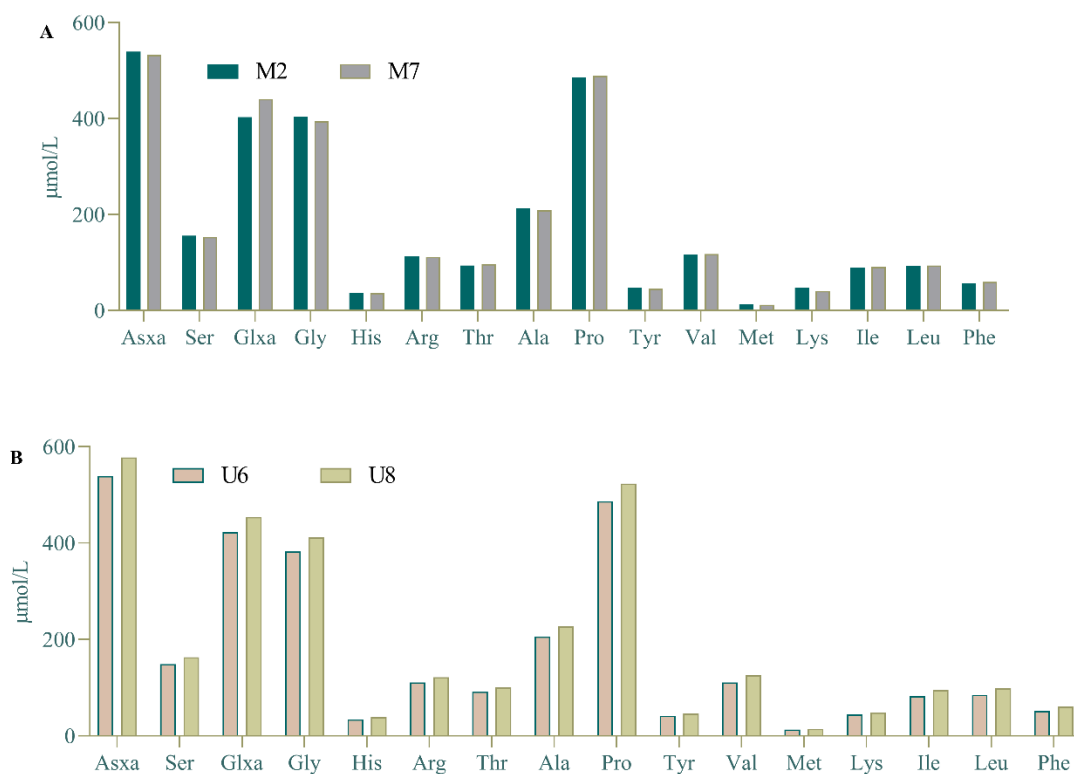
Slika 26. Usporedba prinosa proteina (mg/L) dobivenih u izabranim uvjetima MAE (M) i UAE (U) (s najvećim prinosima).

*M2- 9 min/200 W; M7- 9 min/150 W; U8- 3 min/100 %; U3- 9 min/100 %; U1- 6 min/100 %. Uzorci označeni različitim slovima pripadaju različitim statističkim skupovima ($p < 0.05$).

U nedavnom istraživanju Wen i suradnici (46) usporedili su primjenu MAE i UAE za ekstrakciju proteina iz SPK, ali primjenom sukcesivne lužnate i kiselinske ekstrakcije – zelena ekstrakcija vodom kao otapalom do danas nije istražena. U tom istraživanju, veći prinosi postignuti su primjenom MAE (10 i 20 min) u usporedbi s UAE (10 min). Među proučavanim tehnikama ekstrakcije, utvrđeno je da MAE daje najveći prinos proteina (43,53 %) s prosječnom molekularnom masom od 6,64 kDa. Uspoređujući ovo s konvencionalnim metodama odnosno sekvencijalnog izdvajanja s NaOH, a zatim s HCl u dvije različite koncentracije (0,2 M i 0,6 M), prinosi su značajno povećani za 2,8 puta i 2,3 puta primjenom UAE, te 5,8 puta i 7 puta primjenom MAE. Proizlazi kako UAE i MAE

imaju potencijal da budu brze i učinkovite metode za ekstrakciju proteina iz SPK. Kao i u ovom radu, prinosi su se povećavali s porastom amplitude ultrazvučne sonde odnosno jačine mikrovalova. Analiza aminokiselinskog sastava proteinskih ekstrakata SPK pokazuje da su najzastupljenije aminokiseline u dobivenim ekstraktima asparaginska kiselina (Asp), asparagin (Asn), glutaminska kiselina (Glu), glutamin (Gln), prolin (Pro) i glicin (Gly), neovisno o tipu ili uvjetima ekstrakcije (Slika 27). Važno je napomenuti da su u proteinskim ekstraktima bile prisutne sve esencijalne aminokiseline. U radu Wen i suradnika (46) ustanovljeno je kako je najzastupljenija aminokiselina u proteinskim ekstraktima SPK bio glicin ($48,59 \pm 1,01$ %), druga najzastupljenija je bila asparaginska kiselina, a treća glutaminska kiselina. Navedene razlike u dobivenim rezultatima u odnosu na rezultate u ovom radu vjerojatno su posljedica različitih uvjeta ekstrakcije (sukcesivna primjena kiseline i lužine naspram primjene vode kao ekstrakcijskog otapala). Naime, sukcesivna primjena kiseline i lužine može omogućiti temeljitiju razgradnju proteina pri čemu se oslobađa veća količina slobodnih aminokiselina. To objašnjava veću zastupljenost glicina u rezultatima, budući da je glicin mali i stabilan pod tim uvjetima. Isto tako, kiselinska i lužnata obrada mogu uzrokovati selektivnu degradaciju ili modifikaciju određenih aminokiselina, što mijenja njihov ukupni profil u ekstraktu.

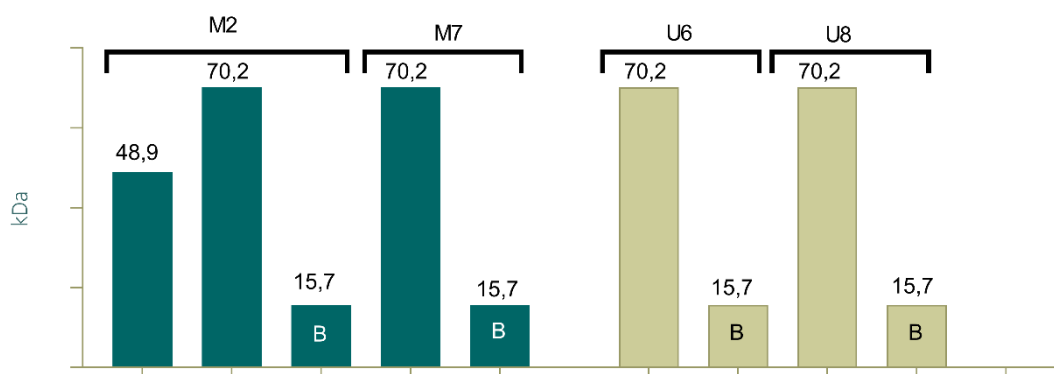
Moguća je i interakcija s matriksom SPK jer kiselina i lužina mogu razgraditi druge komponente matriksa (npr. polisaharide ili fenolne spojeve), čime se dodatno olakšava oslobađanje proteina i aminokiselina. S druge strane, voda je neutralno otapalo koje neće drastično promijeniti strukturu proteina. Ekstrakcija proteina u vodi ovisi uglavnom o topljivosti proteina pri danom pH i temperaturi. Manja denaturacija i hidroliza proteina znači da će oslobođene aminokiseline biti ograničene na one koje su prirodno prisutne kao slobodne aminokiseline.



Slika 27. Usporedba aminokiselinskog sastava proteinskih ekstrakata dobivenih postupcima MAE (Slika A) i UAE (Slika B) u odabranim uvjetima pri kojima su postignuti najveći prinosi

Osim njihove vrijednosti kao esencijalnih nutrijenata, proteine možemo promatrati i kao potencijalne izvore bioaktivnih peptida – malih peptida koji se mogu apsorbirati iz probavnog trakta, a u organizmu ispoljavaju različite biološke učinke. Izvori životinjskog podrijetla posebno su bogati bioaktivnim peptidima, npr. kravlje mlijeko i njegovi derivati, kao što su sir i jogurt, dobro su poznati po svom visokom sadržaju peptida koji mogu pokazati antioksidativno, antihipertenzivno i antimikrobno djelovanje. Ostali životinjski izvori uključuju jaja, meso i ribu, a koji također doprinose raznolikosti bioaktivnih peptida dostupnih za terapijske primjene. Iako su proteini životinjskog porijekla osobito prepoznati kao izvori bioaktivnih peptida, biljni proteini se također istražuju u tom kontekstu - mahunarke poput soje i graška, kao i žitarice poput pšenice i riže, sadrže peptide koji mogu imati antikancerogena i protuupalna svojstva (118, 119). Proteini koji sadrže Barwinovu domenu, kao što je sam protein sjemena ječma posebno se istražuju upravo zbog svog potencijala za proizvodnju bioaktivnih peptida. Protein s Barwinovom domenom sadrži

125 aminokiselina i tri disulfidna mosta koje formiraju oksidirani pobočni lanci cisteina. Barwinova domena je specifična proteinska struktura koja se nalazi u proteinima povezanim s obranom biljaka i razgradnjom RNA. Ova domena je prvi put identificirana u Barwinovom proteinu, koji je prisutan u ječmu (*Hordeum vulgare*), a kasnije je otkrivena u mnogim drugim biljkama, gljivama pa čak i nekim bakterijama. Barwinova domena je obično mala i kompaktna proteinska domena, s prepoznatljivom stabilnom strukturom koja omogućuje vezanje na različite molekule, poput RNA ili komponenti staničnih stijenki patogena. Proteini s Barwinovom domenom često pokazuju aktivnost ribonukleaze, što znači da mogu razgraditi RNA molekule. To je važno u obrani biljaka jer patogeni često koriste RNA u napadima na biljne stanice. Ova domena također može biti uključena u antimikrobne aktivnosti, kao dio biljne obrane protiv patogena poput bakterija i gljiva. Proteini s Barwinovom domenom sudjeluju u različitim biološkim procesima povezanim s obrambenim mehanizmima biljaka, uključujući odgovor na biotski (patogeni) i abiotski (suša, hladnoća) stres. Njegova biološka uloga u biljkama još nije poznata i u potpunosti istraжена, ali bi zbog vezanja oligosaharida mogao biti potencijalni biljni lektin. Prisutnost Barwinove domene sugerira da bi se takav protein mogao iskoristiti za ciljano dobivanje peptida sa specifičnim funkcijama, kao što su antimikrobna svojstva, a što ih čini potencijalno značajnima za biotehnošku primjenu (u poljoprivredi i medicini) (109). Molekulske mase najzastupljenijih proteina u ekstraktima SPK iznosile su 15,7 i 70,2 kDa u ekstraktima dobivenim UAE te 15,7, 48,9 i 70,2 u ekstraktima dobivenim MAE pri čemu je utvrđeno da protein molekulske mase 15,7 kDa sadrži Barwinovu domenu (Slika 28).



Slika 28. Mase najzastupljenijih proteina u ekstraktima SPK dobivenim MAE (M) i UAE (U) postupcima s najvećim prinosima

*M2- 9 min/200 W; M7- 9 min/150 W; U8- 3 min/100 %; U1- 6 min/100 %. Uzorci označeni različitim slovima pripadaju različitim statističkim skupovima ($p < 0,05$).

Činjenica da je u M2 ekstraktu određena značajna prisutnost proteinske frakcije veličine 48,9 kDa (a koja nije bila prisutna u ostalim ekstraktima) pokazuje da ekstrakcijski uvjeti mogu značajno utjecati na molekulsku masu proteina prisutnih u ekstraktima. Navedeno je u skladu s opažanjima koja proizlaze iz usporedbe ovih rezultata s istraživanjima drugih autora.

Wen i sur. su u svom istraživanju (46) kao glavni čimbenik koji će odrediti veličinu proteina u ekstraktu definirali pH i to uspoređivanjem molekulske mase proteina u ekstraktima dobivenim klasičnom (24 h) te MAE i UAE ekstrakcijom (do 30 min) primjenom kiseline (HCl) ili lužine kao otapala. Molekulske mase proteina kretale su se, ovisno o tipu ekstrakcije, od 4,99 do 6,89 kDa, s tim da su dobiveni ekstrakti sadržavali i peptide molekulske mase manje od 1 kDa. Navedene razlike posljedica su činjenice da je u navedenom slučaju tijekom procesa ekstrakcije došlo do hidrolize proteina. Kao i u ovom radu, kromatografski profili proteinskih ekstrakata dobivenih postupkom MAE i UAE, kod jednakog pH, međusobno se nisu značajno razlikovali.

5.3 Valorizacija srebrne pokožice kave kao sekundarne sirovine za dobivanje polifenola – usporedba MAE i UAE

SPK je u posljednjih desetak godina prepoznat kao potencijalno vrijedan izvor polifenolnih spojeva te su već istražene prednosti i nedostaci različitih vrsta ekstrakcije, od klasične ekstrakcije otapalom (maceracije) do primjene zelenih ekstrakcijskih tehnika (UAE, MAE i slično). Iz dostupnih literaturnih rezultata vidljivo je da količina polifenola u ekstraktima značajno varira ovisno o uvjetima ekstrakcije, načinu ekstrakcije, omjeru masa uzorka: volumen otapala te korištenom ekstrakcijskom sredstvu. Osim toga, različite vrste kave odnosno uvjeti procesiranja mogu značajno utjecati na količinu ukupnih polifenola u SPK. Panusa i suradnici su za dobivanje ekstrakata bogatih polifenolima koristili postupak maceracije (60 °C kroz 30 minuta, u omjeru uzorak:otapalo 1:50), a ukupni udio polifenola u dobivenim ekstraktima kretao se od 435 mg/100 g do 1282 mg/100 g (izraženo kao ekvivalenti galne kiseline - EGK) (53). Zhang i suradnici su primjenom UAE dobili ekstrakte sa sadržajem ukupnih polifenola od $286 \pm 0,08$ mg EGK/100 g (76). Wen i

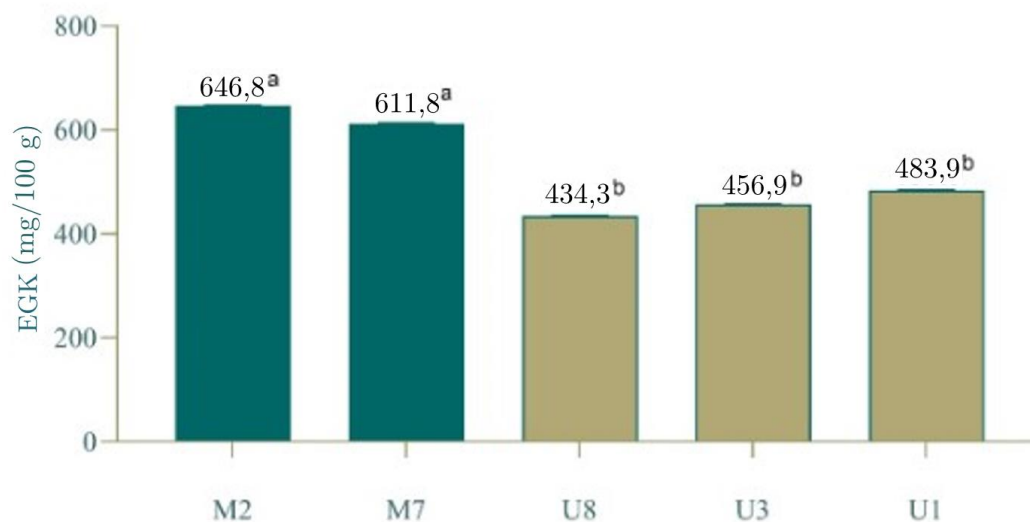
suradnici proveli su istraživanje slično našem – optimizirali su MAE polifenole iz SPK korištenjem deionizirane vode kao otapala. U svom su istraživanju pokazali da se maksimalni prinosi polifenola ($600 \pm 0,14$ mg EGK/100 g) postižu kod snage i trajanja ekstrakcije veće nego što je bilo primijenjeno u našem istraživanju (12 min i 434,7 W). Parametri ekstrakcije u tom istraživanju bili su nešto drugačiji, vrijeme ekstrakcije bilo je 4, 8 i 12 minuta, a snaga mikrovalova 196,9 W; 302,4 W te 434,7 W (77). Najviše vrijednosti ukupnih fenola u ekstraktima SPK dobili su Zengin i suradnici (2049 mg EGK/100 g) koji su vodene ekstrakte dobili postupkom UAE u trajanju od čak 120 min (40 Hz/20°C) (120) iz čega je vidljivo da produženo vrijeme ekstrakcije rezultira povećanim prinosima polifenola. Primjenom kiselinske ili lužnate ekstrakcije također se mogu ostvariti nešto viši prinosi polifenola. Mussatto i suradnici su dokazali porast temperature te korištenje kiseline i lužine rezultiraju značajno višim prinosima polifenola u ekstraktima u odnosu na vodu (121). U ispitivanim ekstraktima, najveća masena koncentracija polifenola (130 mg EGK/100 g) postignuta je ekstrakcijom sa 60 %-tnim etanolom kao otapalom. Vrijeme ekstrakcije bilo je 30 minuta, a ekstrakcijska smjesa je temperirana na temperaturi od 60 do 65 °C. U istom istraživanju provedena je i kruto-tekuća ekstrakcija polifenola s deioniziranom vodom, otopinom 0,1 M HCl i otopinom 0,1 M NaOH kao otapalom, pri temperaturama od 25 do 80 °C. Uz upotrebu tih otapala su postignuti znatno niži maseni udjeli polifenola od 500 do 800 mg EGK/100 g. Najviši rezultat je postignut s otopinom 0,1 M NaOH kao otapalom, pri temperaturi od 80 °C, a najniži s otopinom 0,1 M HCl kao otapalom, pri temperaturi od 25 °C.

Glavni cilj ovog istraživanja bio je dobiti proteinske ekstrakte SPK bogate polifenolima, odnosno istražiti je li moguće pod blažim ekstrakcijskim uvjetima koji primarno odgovaraju ekstrakciji proteina dobiti i značajne udjele polifenola. Naime, dobivanje proteinskih ekstrakata bogatih polifenolima iz sirovina nudi značajne prednosti u odnosu na standardne proteinske ekstrakte bez tih spojeva. Zbog svojih antioksidativnih, protuupalnih i antimikrobnih svojstava, polifenoli mogu dodatno poboljšati funkcionalna svojstva proteinskog ekstrakta, a mogu i pozitivno djelovati na stabilnost i bioraspoloživost proteina prisutnih u ekstraktu. Nedavne kliničke studije su pokazale da suplementacija proteinskim ekstraktima bogatim polifenolima intenzivira neke metaboličke putove te smanjuje oksidativni stres što govori u prilog korištenju ovakvih kompleksnih ekstrakata u kreiranju nutraceutika i dodataka prehrani (122, 123). Stoga integracija proteinskih ekstrakata bogatih polifenolima predstavlja obećavajući put za inovacije u prehrambenoj

tehnologiji i potencijalnom primjenom korisnom za zdravlje.

U tom smislu danas se u prehrambenoj industriji najviše koriste ekstrakti soje ili drugih uljarica koji su također visokovrijedni izvori proteina. Međutim, ekstrakti dobiveni iz pokožice kave predstavljaju zeleniji pristup formulaciji nutraceutika i funkcionalnih prehrambenih proizvoda jer koriste održivi resurs - otpad prehrambene industrije. S druge strane, široka primjena ovakvih produkata je izazovna zbog niza razloga - postojeće regulative koja postavlja visoke zahtjeve za korištenje novih sastojaka u prehrambenoj industriji, prihvaćenosti od strane potrošača te moguće problematičnih senzornih svojstava i neželjenih utjecaja na teksturu i okus konačnog proizvoda.

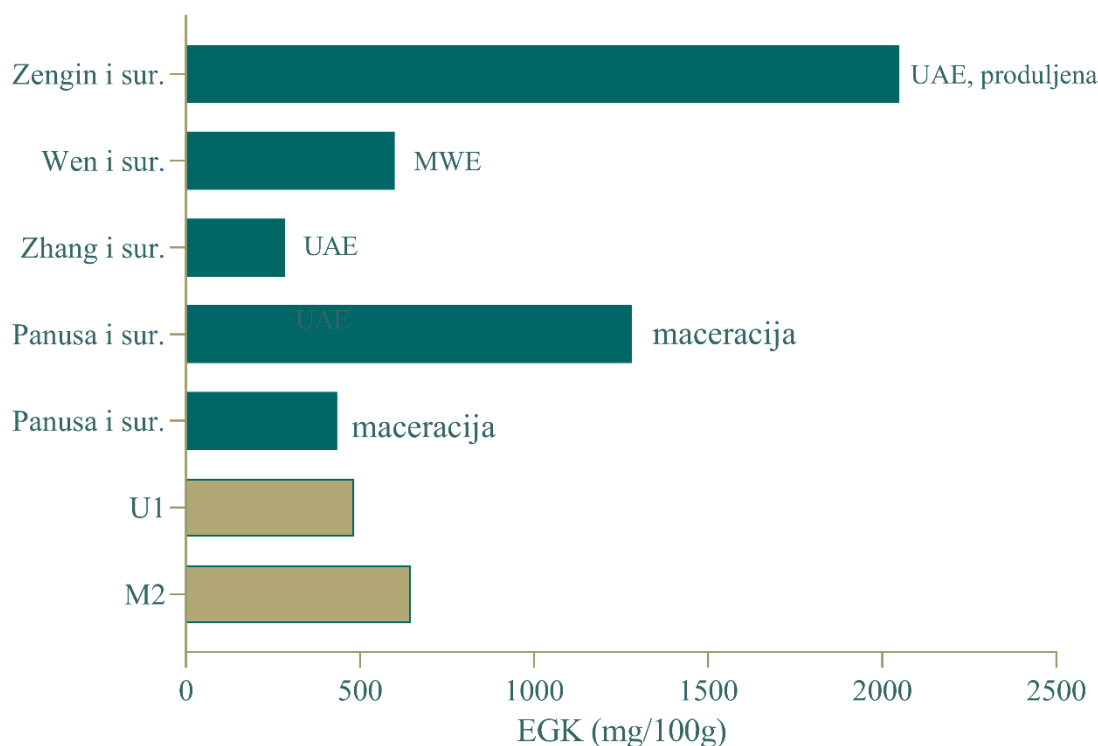
Rezultati našeg istraživanja pokazali su da se u uvjetima optimalnim za ekstrakciju proteina iz SPK ekstrahira i značajna količina polifenola, pri čemu se ipak MAE pokazala značajno boljom od UAE (što nije slučaj s ekstrakcijom proteina) (Slika 29). Vrijednosti udjela polifenola u ekstraktima s najvećim prinosima proteina kretale su se od 434,3 mg/100 g EGK (U8) do 646,8 mg/100 g EGK (M2). Promjena uvjeta ekstrakcije za svaku od primijenjenih ekstrakcijskih tehnika, u rasponima definiranim za optimizaciju ekstrakcije proteina, nisu značajno utjecale na prinose polifenola.



Slika 29. Udio polifenola (EGK) u MAE (M) i UAE (U) ekstraktima SPK s najvećim prinosima proteina.

*M2-9 min/200 W; M7-9 min/150 W; U8-3 min/100 %; U3-9 min/100 %; U1-6 min/100 %. Uzorci označeni različitim slovima pripadaju različitim statističkim skupovima ($p < 0,05$).

Prinosi polifenola ostvareni u ovom radu usporedivi su s vrijednostima dostupnim u literaturi te možemo zaključiti da se u uvjetima pogodnim za ekstrakciju proteina koekstrahiraju značajne količine polifenola, usporedive s onima koje se dobivaju u uvjetima optimiziranim za ekstrakciju fenolnih komponenti (Slika 30).



Slika 30. Usporedba udjela polifenola u MAE i UAE ekstraktima SPK (najviše vrijednosti, izražene u mg/100 g) i udjela polifenola u ekstraktima SPK dostupnim u literaturi M2-9min/200W; U1-6min/100min.

Iz prikazanih podataka i uvida u dostupne publikacije načelno se može zaključiti da produljeno vrijeme ekstrakcije i više temperature pogoduju postizanju većih prinosa polifenola. Bilo kakve konkretnije zaključke o primjenjivosti pojedinih metoda je teško istaknuti, zbog velike varijabilnosti uvjeta ekstrakcije koje su koristili pojedini autori (tehnika, otapalo, omjer mase uzorka i volumena otapala, trajanje ekstrakcije i temperatura ekstrakcije). Osim toga, važno je napomenuti da je udio polifenola u bilo kojoj sirovini, uključujući i SPK, izrazito varijabilan te ovisi o biljnoj sorti, agroklimatskim uvjetima u kojima je biljka rasla, načinu prikupljanja, načinu skladištenja te načinu pred-procesiranja sirovine (124, 125). Ono što je drugačije u svim citiranim istraživanjima jest da je udio polifenola određivan Folin-Ciocalteu metodom, koja nije selektivna za fenolne

komponente već detektira sve spojeve s reducirajućim učinkom. To dodatno komplicira tumačenje rezultata jer tijekom procesa prženja kave, ovisno o primijenjenim uvjetima može doći do degradacije dijela antioksidansa prirodno prisutnih u SPK, a također dolazi do formiranja produkata Maillardove reakcije od kojih neki mogu imati značajan reduktivni učinak (126, 127).

Stoga je za procjenu primjenjivosti pojedinih ekstrakcijskih postupaka za ekstrakciju polifenola SPK potrebno provoditi kontrolirana i ciljana istraživanja koja uzimaju u obzir sve navedene čimbenike.

5.4 Ugljični otisak dobivanja proteinskog ekstrakta srebrne pokožice kave – važnost procesa ekstrakcije i upravljanja otpadom

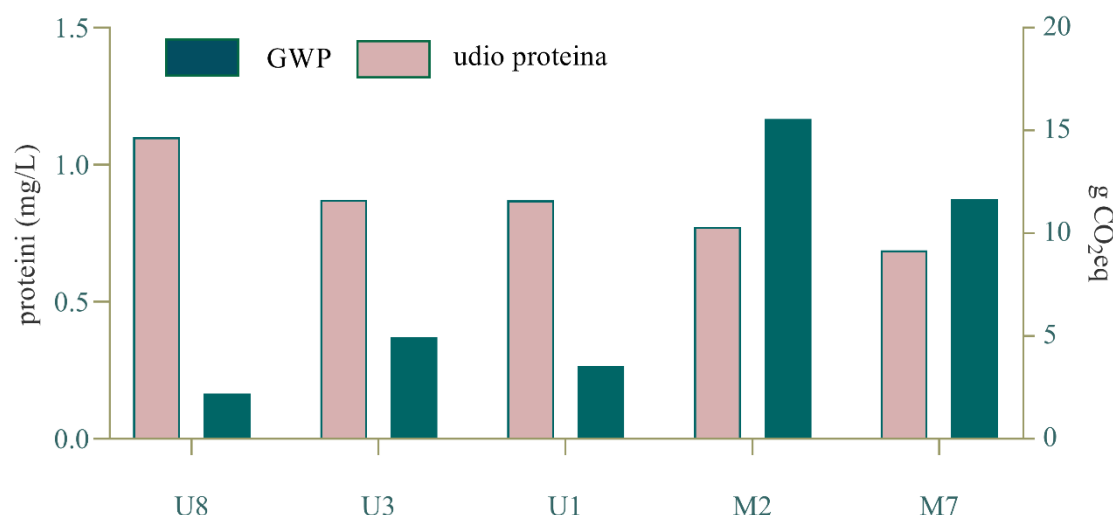
Procjena životnog ciklusa (LCA) nutraceutika presudna je za razumijevanje utjecaja njegove proizvodnje na okoliš tijekom cijelog životnog ciklusa, od ekstrakcije sirovine preko proizvodnje, distribucije i upotrebe do odlaganja. Ova sveobuhvatna procjena pomaže identificirati one faze života proizvoda koje najviše pridonose degradaciji okoliša te na taj način omogućuje donošenje informiranih odluka kojima se može povećati održivost. Integriranje podataka o nutritivnoj vrijednosti hrane/nutraceutika s kvantificiranim podacima o utjecaju na okoliš, omogućuje usklađivanje potencijalne direktne zdravstvene dobrobiti hrane/nutraceutika s zdravstvenim dobrobitima smanjenja ekološkog otiska, čime se potrošače usmjerava prema održivijim izborima (128). Nadalje, u kontekstu porasta potražnje za održivim proizvodima, provođenje LCA postaje ključan alat za poboljšavanje tržišne konkurentnosti uz ispunjavanje regulatornih zahtjeva i očekivanja potrošača za transparentnošću i odgovornošću u praksi nabave proizvoda i proizvodnje.

Procjena životnog ciklusa (LCA) procjenjuje nekoliko vrsta ekoloških otisaka te omogućuje sveobuhvatno razumijevanje utjecaja proizvoda na okoliš tijekom cijelog životnog ciklusa. Ključne vrste ekoloških otisaka koje procjenjuje LCA uključuju: ugljični otisak koji mjeri emisije stakleničkih plinova; vodeni otisak koji procjenjuje ukupnu količinu slatke vode koja se koristi izravno i neizravno u procesu proizvodnje; ekološki otisak koji uzima u obzir korištenje zemljišta za sirovine, potrošnju energije i stvaranje otpada; iscrpljenost resursa gdje se ispituje potrošnja obnovljivih i neobnovljivih resursa tijekom životnog ciklusa proizvoda i onečišćenje zraka. Ovo istraživanje usmjereno je

primarno na proces ekstrakcije gdje se odgovarajućim odabirom ekstrakcijske tehnike i optimizacijom ekstrakcijskih uvjeta primarno može utjecati na potrošnju energije, a time i na emisije stakleničkih plinova. Stoga je provedba LCA bila usmjerena upravo na analizu ugljičnog otiska različitih ekstrakcijskih postupaka izraženu kao GWP.

Općenito se može primijetiti da je GWP često viši kod standardnih ekstrakcijskih tehnika u usporedbi s modernim metodama kao što su UAE i MAE. Razlog za to su veća potrošnja energije, duže trajanje procesa i veća upotreba kemijskih otapala koja pridonose ukupnom ekološkom otisku. Destilacija s vodenom parom i Soxhlet ekstrakcija zahtijevaju dugo zagrijavanje i održavanje visokih temperatura tijekom cijelog procesa, što troši veliku količinu energije, posebno ako se koriste neobnovljivi izvori energije. Perkolacija i maceracija često traju dulje (od nekoliko sati do dana), što znači da oprema radi dulje i troši više energije. Ekstrakcija organskim otapalima (npr. heksan, metanol, acetonitril itd.) ne samo da troši energiju za zagrijavanje, već i za naknadno isparavanje otapala i pročišćavanje ekstrakata, što dodatno povećava GWP. Otopine i pare organskih otapala imaju ekološke posljedice, uključujući emisiju hlapivih organskih spojeva (VOC) koji doprinose efektu staklenika i onečišćenju zraka. Dodatno, ekstrakcija otapalima stvara kemijski otpad koji zahtijeva zbrinjavanje, a procesi zbrinjavanja također doprinose GWP-u zbog dodatne energije potrebne za obradu otpada.

Primjena MAE i UAE obično se smatra ekološki prihvatljivijim od klasičnih postupaka ekstrakcije, najviše zbog povećane iskoristivosti ekstrakcijskog procesa u kraćem vremenu, što rezultira značajno manjom potrošnjom energije i značajno smanjuje ukupan GWP. To ih čini metodama izbora u kontekstu smanjenja utjecaja na okoliš. Usporedbe ugljičnog otiska MAE i UAE postupaka u literaturi, prema trenutačnim saznanjima, ne postoje te je ovo istraživanje bilo usmjereno upravo na tu usporedbu. Rezultati jasno pokazuju da iako se MAE i UAE mogu smatrati usporedivima u smislu primjenjivosti za ekstrakciju proteina (gdje se veći prinosi ostvaruju postupkom UAE) i polifenola (gdje se veći prinosi ostvaruju primjenom MAE), primjena UAE rezultira značajno nižim ugljičnim otiskom (Slika 31).



Slika 31. Prinosi proteina i GWP/ciklusu za odabrane uvjete UAE i MAE

M2-9 min/200 W; M7-9 min/150 W; U8-3 min/100 %; U3-9 min/100 %; U1-6 min/100 %.

Uzorci označeni različitim slovima pripadaju različitim statističkim skupovima ($p < 0.05$).

Rezultati ovog istraživanja jasno pokazuju da je ugljični otisak jednog ciklusa mikrovalne ekstrakcije višestruko veći u usporedbi s ciklusom ultrazvučne ekstrakcije što UAE čini metodom odabira za zelenu proizvodnju SPK (uz pretpostavku usporedivih prinosa) odnosno tehnikom značajno nižeg ugljičnog otiska od MAE. Navedene razlike posljedica su činjenice da ekstrakcija mikrovalovima koristi mikrovalne pećnice koje troše značajnu količinu električne energije za stvaranje mikrovalnih valova potrebnih za zagrijavanje uzorka. Mikrovalovi stvaraju toplinsku energiju koja zagrijava otapalo i uzorak (i to iznutra prema van). Iako može biti vrlo učinkovita, u smislu skraćivanja vremena potrebnog za ekstrakciju, energetska potrošnja mikrovalnih uređaja može biti visoka, posebno za veće količine uzoraka. Ultrazvučni uređaji, s druge strane, koriste piezoelektrične nosače koji pretvaraju električnu energiju u mehaničke vibracije (ultrazvuk). Ove vibracije potom stvaraju kavitacijske mjehuriće u otapalu koji kolabiraju i stvaraju lokalizirano zagrijavanje i mehaničke sile koje olakšavaju ekstrakciju. Iako i takva ekstrakcija zahtijeva električnu energiju, obično troši manje energije u usporedbi s mikrovalnim pećnicama. Veće energetske zahtjeve MAE može dodatno povećati i održavanje i hlađenje mikrovalnih uređaja, dok s druge strane, ultrazvučni uređaji obično zahtijevaju manje infrastrukture i dodatnih resursa za rad.

Način proizvodnje električne energije (npr. iz obnovljivih izvora naspram fosilnih goriva)

također značajno utječe na ukupni GWP - ako se električna energija dobiva iz fosilnih goriva, GWP će biti značajno veći u usporedbi sa scenarijem u kojem se energija dobije iz obnovljivih izvora. Iako rezultati našeg istraživanja potvrđuju manji GWP kod UAE u odnosu na MAE, treba biti oprezan s generalizacijom ovih rezultata. Važno je naglasiti da stvarni utjecaj na GWP može značajno varirati ovisno o specifičnosti laboratorija ili industrijskog postrojenja, izvoru energije i uvjetima ekstrakcije, kao i o vrsti materijala koji se obrađuje. Za točnu procjenu GWP-a potrebno je uvijek provesti LCA analizu odnosno procjenu životnog ciklusa za obje tehnike uzimajući u obzir sve ulazne i izlazne parametre, uključujući vrstu i izvor energije, otpala i učinkovitost procesa.

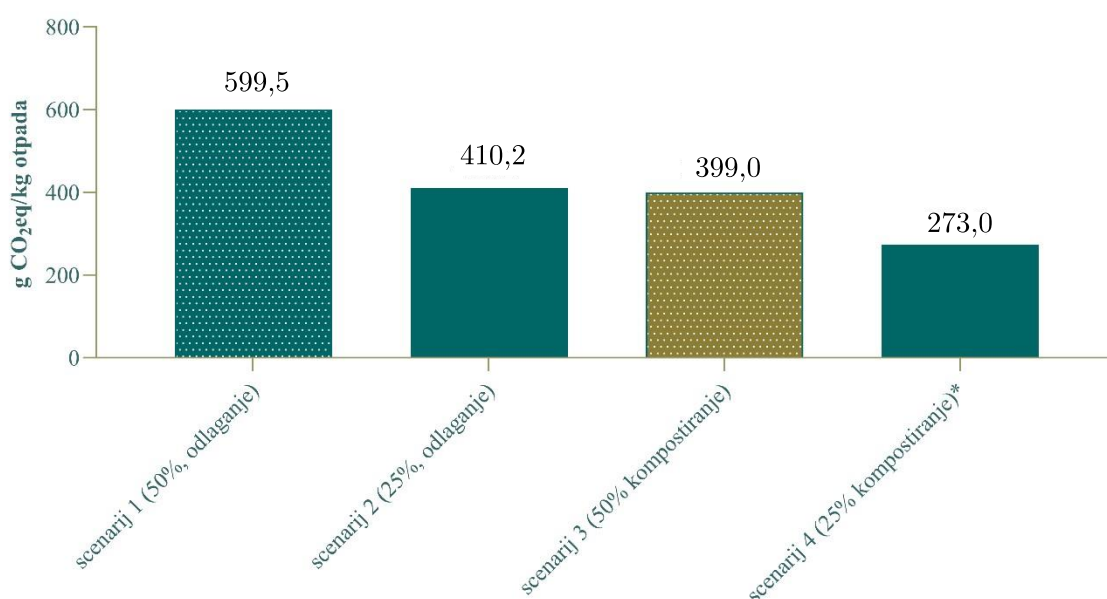
Ako se razmotre rezultati GWP različitih uvjeta UAE, proizlazi da najveći potencijal globalnog zatopljenja ima uzorak U3 s GWP od 4,95 g CO₂e, odnosno da porastom vremena tretiranja uzorka dolazi do povećanja istog, uz linearno povećanje amplitude. Međutim, povećanje je intenzivnije povećanjem vremena.

Iz navedenog primjera razvidno je kako se ekološka prihvatljivost procesa dobivanja nekog produkta može poboljšavati s više aspekata: odabirom sekundarne sirovine čime se minimizira ekološki otisak i potencijal iscrpljivanja resursa; odabirom vode kao ekstrakcijskog sredstva (čime se minimizira ekološki otisak) te odabirom odgovarajuće ekstrakcijske tehnike koja će uz zadržavanje prihvatljivog prinosa osigurati smanjenu potrošnju energije, a samim time i smanjen ugljični otisak procesa. Fokusiranje na smanjenje ugljičnog otiska danas je ključan aspekt minimalizacije ukupnog utjecaja na okoliš, uzimajući u obzir urgentnost klimatske krize.

Osim potrošnje energije, vrlo važan aspekt je minimalizacija količine otpada koja nastaje tijekom procesa. Ovo istraživanje je pokazalo da je porast GWP proizvodnog procesa proporcionalan količini nastalog otpada. Kompostiranjem otpada postižu se dodatna smanjenja emisija stakleničkih plinova (u odnosu na samo odlaganje otpada) što je u skladu s rezultatima istraživanja Ansanelli i suradnika koji su također primijenili LCA metodologiju za istraživanje učinkovitosti kompostiranja otpada koji zaostaje nakon prženja kave kao mjere za smanjenje ugljičnog otiska proizvodnog procesa (116). U navedenom radu istražena su tri scenarija upravljanja otpadom – u prvom scenariju, biootpad tvrtke za prženje kave odlaže se na odlagalište što rezultira GWP-om od 756,94 g CO₂e/kg otpada. U drugom scenariju, otpad se kompostira te zamjenjuje 12 kg sintetičkih N, K i P gnojiva po toni SPK, a u trećem scenariju 1 tona SPK-a valorizirana je kao funkcionalni sastojak pekarskih proizvoda, zamjenjujući 950 kg pšeničnog brašna.

Rezultati su pokazali da kompostiranje značajno smanjuje GWP u odnosu na odlaganje na odlagalište otpada, međutim predstavlja ekonomski trošak za tvrtku jer prihod od prodaje komposta nije dostatan da nadoknadi troškove kompostiranja. Najveće smanjenje GWP-a postignuto je korištenjem SPK kao funkcionalne sastavnice pekarskih proizvoda, a navedeni scenarij je i ekonomski povoljniji za proizvođača kave jer smanjuje troškove upravljanja otpadom što ukazuje na višestruke koristi prihvaćanja koncepta kružne ekonomije u smislu ponovnog korištenja otpada /sekundarnih sirovina (što je primijenjeno i u našem istraživanju).

U ovom istraživanju predložen je alternativni oblik upravljanja otpadom od prženja kave - iskorištavanje za dobivanje funkcionalnog ekstrakta bogatog proteinima i polifenolima. Ipak i nakon tog postupka zaostaje oko 50 % inicijalne količine otpada koji se može odložiti na deponij ili kompostirati (scenarij 1 i scenarij 2). Daljnje smanjenje GWP u ovom smislu moglo bi se postići ili uzastopnim ekstrakcijama ili optimizacijom ekstrakcijskih postupaka koji bi generirali manje količine otpada (scenarij 3 i scenarij 4). Ukupni GWP za sva četiri scenarija prikazan je na Slici 32.



Slika 32. GWP dobivanja proteinskog ekstrakta SPK primjenom optimalnog UAE postupka (U8) u različitim scenarijima količine nastalog otpada i procesiranja otpada.

*procijenjeni utjecaj kombiniranog postupka kompostiranja i smanjenja količine zaostalog otpada

Iz Slike 32 je vidljivo da će kompostiranje otpada rezultirati značajnim ukupnim (neto) smanjenjem ugljičnog otiska u odnosu na odlaganje na deponij pri čemu će stvaran učinak varirati ovisno o specifičnim uvjetima kompostiranja, tehnološkom procesu i lokalnim praksama gospodarenja otpadom. Pozitivan učinak kompostiranja u odnosu na odlaganje na deponij je u prvom redu posljedica smanjenja emisija metana, koji ima snažniji potencijal globalnog zatopljenja od CO₂, ali i činjenice da kompostiranjem smanjujemo potrebu za energijom u proizvodnji kemijskih gnojiva; smanjujemo emisije visoko potentnih dušikovih oksida koji se javljaju kao posljedica primjene dušičnih gnojiva te uzrokuju zagrijavanje, ali i smanjujemo emisije transporta otpada. Sve zajedno onda značajno pridonosi smanjenju ugljičnog otiska.

6. ZAKLJUČCI

1. Uzorci SPK su zdravstveno ispravni. Od analiziranih 265 pesticida, u korištenim uzorcima su određena tri pesticida i to flutriafol, imidaklopid i piperonil butoksid, ali u koncentracijama nižim od maksimalno dopuštenih ostataka. Od teških metala, u ispitivanim uzorcima najvišu koncentraciju imao je nikal ($2,495 \pm 0,055$ mg/kg), a u puno manjim koncentracijama određeni su olovo ($0,249 \pm 0,077$ mg/kg), arsen ($0,107 \pm 0,018$ mg/kg) te kadmij ($0,106 \pm 0,002$ mg/kg).
2. U odnosu na klasične ekstrakcijske tehnike, primjena MAE i UAE u dobivanju proteinskih ekstrakata omogućila je smanjeno vrijeme ekstrakcije, korištenje manjih količina otapala te primjenu ekološki prihvatljivog otapala (voda). Obje metode omogućuju preciznu kontrolu parametara (vrijeme, snaga, temperatura, frekvencija) što olakšava optimizaciju procesa za specifične ciljeve istraživanja.
3. UAE je prihvatljivija tehnika za dobivanje proteina iz SPK. Naime, iako i MAE i UAE omogućuju ekstrakciju proteina korištenjem vode kao otapala i u puno kraćem vremenu (3-9 min) u odnosu na klasične tehnike ekstrakcije (koje uobičajeno traju oko 24 sata), prinosi dobiveni procesom UAE značajno su veći. Kod mikrovalne ekstrakcije najveću vrijednost koncentracije (prinos) ukupnih proteina imao je uzorak M2 ($0,77 \pm 0,07$ mg/L) koji je tretiran 9 minuta mikrovalovima snage 200 W, a na prinos proteina značajno su utjecali snaga mikrovalova, vrijeme ekstrakcije i njihov međusobni odnos. Kod ultrazvučne ekstrakcije najveću vrijednost koncentracije (prinos) ukupnih proteina imao je uzorak U8 ($1,10 \pm 0,08$ mg/L) koji je tretiran ultrazvukom 3 minute i amplitudom 100 %, a na prinos proteina značajno su utjecali trajanje ekstrakcije i amplituda te njihov međusobni odnos.
4. Proteinski ekstrakti SPK sadržavali su sve esencijalne aminokiseline. Najzastupljenije aminokiseline u dobivenim ekstraktima su asparaginska kiselina (Asp), asparagin (Asn), glutaminska kiselina (Glu), glutamin (Gln), prolin (Pro) i glicin (Gly), neovisno o tipu ili uvjetima ekstrakcije.
5. Molekulske mase najzastupljenijih proteina u ekstraktima SPK dobivenim UAE iznosile su 15,7 i 70,2 kDa, a u ekstraktima SPK dobivenim MAE iznosile su 15,7, 48,9 i 70,2 kDa, pri čemu je utvrđeno da protein molekulske mase 15,7 kDa sadrži Barwinovu domenu što ukazuje na potencijal za dobivanje bioaktivnih peptida.
6. U optimalnim uvjetima za ekstrakciju proteina iz SPK, ekstrahira se i značajna količina polifenola, pri čemu se ipak MAE pokazala značajno boljom od UAE (što nije slučaj s ekstrakcijom proteina). Vrijednosti udjela polifenola u ekstraktima s najvećim

prinosima proteina kretale su se od 434,3 mg/100 g EGK (U8) do 646,8 mg/100 g EGK (M2). Promjena uvjeta ekstrakcije za svaku od primijenjenih ekstrakcijskih tehnika, u rasponima definiranim za optimizaciju ekstrakcije proteina, nisu značajno utjecale na prinose polifenola.

7. Iako se MAE i UAE mogu smatrati generalno usporedivima u smislu primjenjivosti za ekstrakciju proteina (gdje se veći prinosi ostvaruju primjenom UAE) i polifenola (gdje se veći prinosi ostvaruju primjenom MAE), primjena UAE rezultira značajno nižim GWP (2,21-4,95 g CO₂e/ciklusu u UAE s najvišim prinosima proteina naspram 11,67-15,55 g CO₂e/ciklusu u MAE s najvišim prinosima proteina), a što odgovara očekivanjima s obzirom na razlike u potrošnji energije kod MAE i UAE.
8. Ukupni GWP proteinskih ekstrakata dobivenih iz SPK proporcionalan je količini otpada koji zaostaje nakon procesa ekstrakcije pa optimizacija procesiranja (u smislu minimalizacije nastajanja otpada) može značajno smanjiti GWP, odnosno 599,5 g CO₂e (50 % otpada) naspram 410,2 g CO₂e (25 % otpada). Dodatno smanjenje GWP može se postići kompostiranjem preostalog otpada odnosno 599,5 g CO₂e (50 % otpada, odlaganje na deponij) naspram 399 g CO₂e (50 % otpada, kompostiranje).

7. POPIS LITERATURE

1. Morris J. Coffee - a global history. 1. izd. UK, The Edible series; 2019.
2. Pravilnik o kavi, kavovinama te proizvodima od kave i kavovina, Narodne novine broj 172/2004
3. Tritsch N, Steger MC, Segatz V, Blumenthal P, Rigling M, Schwarz S, et al. Risk assessment of caffeine and epigallocatechin gallate in coffee leaf tea. *Foods* 2022;11, 263. <https://doi.org/10.3390/foods11030263>
4. Klingel T, Kremer JI, Gottstein V, Rajcic de Rezende T, Schwarz S, Lachenmeier DW. A review of coffee by-products including leaf, flower, cherry, husk, silver skin, and spent grounds as novel foods within the European Union. *Foods* 2020;9(5). doi: <https://doi.org/10.3390/foods9050665>
5. Bessada SMF, Alves RC, Oliveira PPM. Coffee Silverskin: A review on potential cosmetic applications. *Cosmetics* 2018;5(1):5. doi: <https://doi.org/10.3390/cosmetics5010005>
6. De Marco I, Riemma S, Iannone R. Life cycle assessment of supercritical CO₂ extraction of caffeine from coffee beans. *The Jour of supercrit fluids* 2018; 133:393–400 doi: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.11.005>
7. Ballesteros LF, Teixeira JA, Mussatto SI. Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food Bioproc Tech* 2014; 7(12):3493–503. doi: <https://10.1007/s11947-014-1349-z>
8. Iriundo-DeHond A, Fernandez-Gomez B, Martinez-Saez N, Martirosyan DM, Garcia MDM, del Castillo MD. Coffee Silverskin: A Low-Cost Substrate for Bioproduction of High-Value Health Promoting Products. *Ann Nutr Food Sci* 2017;1, 1-6
9. Martinez-Saez N, Ullate M, Martin-Cabrejas MA, Martorell P, Genovés S, Ramon D, et al. A novel antioxidant beverage for body weight control based on coffee silverskin. *Food Chem* 2014; 150:227–34. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.100>
10. UN (2015). Transforming Our World: The 2030 agenda for sustainable development. Resolution adopted by the general assembly on 25 September 2015, 42809, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
11. Löfbergs group. Coffee comes full circle: First ever 3D printed coffee station made from waste, 2021. <https://www.mynewsdesk.com/lofbergs/pressreleases/coffee->

[comes-full-circle-first-ever-3d-printed-coffee-station-made-from-waste-3066258](#)

(Pristupljeno: 12.02.2021., 24.05.2023.)

12. Elsilä JE, Dworkin JP, Bernstein MP, Martin MG, Sandford SA. Mechanisms of Amino Acid Formation in Interstellar Ice Analogs. *Astrophys J* 2007; 660(1):911–8. doi: <https://iopscience.iop.org/article/10.1086/513141>
13. Azulay H, Lutaty A, Qvit N. How similar are proteins and origami? *Biomolecules* 2022; 12(5):622. doi: <https://doi.org/10.3390/biom12050622>
14. Karlson P. Biokemija za studente kemije i medicine. 7. izd., (preveli Mildner, P., Mildner, B.), Školska knjiga, Zagreb; 1993; 20-45.
15. Prandi B, Ferri M, Monari S, Zurlini C, Cigognini I, Verstringe S, et al. Extraction and chemical characterization of functional phenols and proteins from coffee (*Coffea arabica*) by-products. *Biomolecules* 2021; 11(11):1571. doi: <https://doi.org/10.3390/biom11111571>
16. Hardman WE. Diet components can suppress inflammation and reduce cancer risk. *Nutr Res* 2014;8(3):233. doi: <https://10.4162/nrp.2014.8.3.233>
17. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *J Clin Nutr*. 2005; 81(1 Suppl):215S-217S. doi: <https://10.1093/ajcn/81.1.215S>
18. Adams D. Insecticides and pesticides: Techniques for crop protection. Library Press, New York, 2017.
19. Jurak G, Sabljak I. Što o proizvodima biljnog podrijetla na hrvatskom tržištu govore analize ostataka pesticida?. *Glasilo biljne zaštite*, 20; 2020. 333-339.
20. Uredba komisije (EZ) (2005) br. 396/2005 o maksimalnim razinama ostataka pesticida u ili na hrani i hrani za životinje biljnog i životinjskog podrijetla i o izmjeni Direktive Vijeća 81/414/EEZ
21. Davies L, O'Connor M, Logan S. Chronic Intake. Pesticide residues in food and drinking water: Human exposure and risks, (Hamilton D. i Crossley S., ured.), John Wiley & Sons, New Jersey, 2004; 213-223.
22. Krivohlavek A, Palac Bešlić I, Jurak G, Gavran M, Mandić Andačić I, Ivešić M, et al. Heavy metals and pesticide residues in small farm cheese production in Croatia—challenge between quality and quantity. *Sustainability* 2024; 16(4):1356–6. <https://doi.org/10.3390/su16041356>
23. Galić K. Metali i slitine. Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani. Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek, 2010.

24. Akram M, Munir N, Daniyal M, Egbuna C, Gaman MA, Onyekere PF, et al. Vitamins and minerals: types, sources and their functions. Functional foods and nutraceuticals (Egbuna C., Dable Tupas G., ured.), Springer, Cham, 2020; 149-172.
25. Bender DV, Krstev S. Makronutrijenti i mikronutrijenti u prehrani čovjeka. *Medicus* 2008; 17: 19-25.
26. Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip toxicol* 2014;7(2):60–72. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>
27. Briffa J, Sinagra E, Blundell R. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon* 2020;6(9):e04691. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>
28. Masindi V, Muedi KL. Environmental contamination by heavy metals. *Heavy Metals*. IntechOpen Limited: London, UK, 2018; pp. 115–133. doi: <https://doi.org/10.5772/intechopen.76082>.
29. Zakon o kontaminantima, Narodne novine broj 39/2013 i 114/2018
30. Uredba komisije (EU) 2023/915 od 25.04.2023. o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani i o stavljanju izvan snage Uredbe (EZ) br. 1881/2006
31. Pravilnik o toksinima, metalima, metaloidima te drugim štetnim tvarima koje se mogu nalaziti u hrani, Narodne novine broj 16/2005
32. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* 2013;117(4):426–36. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
33. Pavlović DM, Ašperger D, Tolić D, Babić S. Development and optimization of the determination of pharmaceuticals in water samples by SPE and HPLC with diode-array detection. *J Sep Sci* 2013;36(18):3042–9. doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201300486>
34. Chen J, Li X, Gao L, Guo S, He F. Microwave treatment of minerals and ores: Heating behaviors, applications, and future directions. *Minerals* 2024;14(3):219–9. doi: <https://doi.org/10.3390/min14030219>
35. Orsat V, Raghavan GSV, Krishnaswamy K. The microwave processing of foods, 2. izd., Woodhead publishing, Cambridge; 2017.

36. Puligundla P. Potentials of microwave heating technology for select food processing applications - a brief overview and update. *J Food Process* 2013;04(11). doi: 10.4172/2157-7110.1000278
37. Kaderides K, Papaoikonomou L, Serafim M, Goula AM. Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. *Chem Eng Process* 2019;137:1–11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.01.006>
38. Vinatoru M, Mason TJ, Calinescu I. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC, Trends Anal Chem* 2017;97:159–78. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>
39. Ajila CM, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Godbout S, Valéro JR. Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Crit rev in biotech* 2010;31(3):227–49. doi: <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513677>
40. Chan CH, Yusoff R, Ngoh GC, Kung FWL. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Jour of chromatography A* 2011;1218(37):6213–25. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.040>
41. Jayasooriya SD, Bhandari BR, Torley P, D’Arcy BR. Effect of high power ultrasound waves on properties of meat: A Review. *Int J Food Prop* 2004 31;7(2):301–19. doi: <https://10.1081/JFP-120030039>
42. Ercan SŞ, Soysal Ç. Use of ultrasound in food preservation. *Nat Sci* 2013;05(08):5–13. doi: <https://10.4236/ns.2013.58A2002>
43. Dukić J, Košpić K, Kelava V, Mavrić R, Nutrizio M, Balen B, et al. Alternative methods for RuBisCO extraction from sugar beet waste: A comparative approach of ultrasound and high voltage electrical discharge. *Ultrason Sonochem* 2023;99:106535–5., doi: <https://10.1016/j.ultsonch.2023.106535>
44. Leighton TG. What is ultrasound? *Prog in Biophys and Mol Biol* 2007;93(1):3–83. doi: <https://10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.026>
45. Mazzotta S, Lettieri S, Ferraro G, Bartoli M, Etzi M, Pirri CD, et al. A concise overview of ultrasound-assisted techniques for the production of 2D materials. *Processes* 2024;12(4):759–9. doi: <https://doi.org/10.3390/pr12040759>
46. Wen L, Álvarez C, Zhang Z, Poojary MM, Lund MN, Sun DW, et al. Optimisation and characterisation of protein extraction from coffee silverskin assisted by

- ultrasound or microwave techniques. *Biomass Convers Biorefin* 2020;11(5):1575–85. doi: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00712-2>
47. Drmić H, Režek Jambrak A. Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol* 2010;2, 22-33.
 48. Kardos N, Luche JL. Sonochemistry of carbohydrate compounds. *Carbohydr Res* 2001;332(2):115–31. doi: [https://10.1016/S0008-6215\(01\)00081-7](https://10.1016/S0008-6215(01)00081-7)
 49. Tiwari BK. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC, Trends Anal Chem* 2015;71:100–9. doi: <https://10.1016/j.trac.2015.04.013>
 50. Chemat F, Huma Z, Khan MK. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrason Sonochem* 2011;18(4):813–35. doi: <https://10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
 51. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* 2013;117(4):426–36. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
 52. Radojčić Redovniković I. Osvježimo znanje: Zelena otapala. *KUI*; 2020. 69, 670-671.
 53. Panusa A, Petrucci R, Lavecchia R, Zuurro A. UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS metabolic profiling and antioxidant capacity of arabica and robusta coffee silverskin: Antioxidants vs phytotoxins. *Food Res Int* 2017;99:155–65. doi: <https://10.1016/j.foodres.2017.05.017>
 54. European platform on life cycle assessment. <https://eplca.jrc.ec.europa.eu/lifecycleassessment.html> pristupljeno 18.10.2023.
 55. Međunarodna organizacija za standardizaciju (International organization for standardization) ISO 14000 <https://www.iso.org/standards/popular/iso-14000-family> (pristupljeno 19.10.2023.)
 56. Curran MA. Goal and scope definition in life cycle assessment, 2017.
 57. Međunarodna organizacija za standardizaciju (International organization for standardization) ISO EC 207,1997 <https://www.iso.org/committee/54808.html> (pristupljeno 18.10.2023.)
 58. Sandholzer D. Ecological evaluation of processes from renewable resources. PhD Thesis, Institute for resource efficient and sustainable systems, Graz University of Technology, 2006.

59. Krotscheck C, Narodoslawsky M. The sustainable process index a new dimension in ecological evaluation. *Ecol Eng* 1996;6(4):241–58. doi: [https://doi.org/10.1016/0925-8574\(95\)00060-7](https://doi.org/10.1016/0925-8574(95)00060-7)
60. Međunarodna organizacija za standardizaciju (International organization for standardization), <https://www.iso.org/sectors/environment/circular-economy> (pristupljeno 18.10.2023.)
61. Međunarodna organizacija za standardizaciju (International organization for standardization), ISO 59004:2024 Kružno gospodarstvo — Rječnik, načela i smjernice za provedbu <https://www.iso.org/standard/80648.html#lifecycle> (pristupljeno 18.10.2023.)
62. Europski zakon o klimi <https://eur-lex.europa.eu/HR/legal-content/summary/european-climate-law.html> (pristupljeno 18.10.2023.)
63. Europski znanstveni savjetodavni odbor za klimatske promjene (2023.), Znanstveni savjeti za utvrđivanje klimatskog cilja na razini EU-a za 2040. i proračuna za stakleničke plinove za razdoblje 2030. – 2050., <https://climate-advisory-board.europa.eu/> (pristupljeno 25.10.2023.)
64. Global footprint network, <https://www.footprintnetwork.org/> (pristupljeno 28.10.2023.)
65. Carbon footprint network <https://www.carbonfootprint.com> (pristupljeno 28.10.2023.)
66. EC (2019) Europski zeleni plan: zaključci. EC- Vijeće Europske unije, Bruxelles, <https://www.consilium.europa.eu/hr/policies/green-deal> (pristupljeno 28.10.2023.)
67. Uredba (EU) 2021/1119 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX%3A32021R1119> (pristupljeno 29.10.2023.)
68. Europski zakon o klimi <https://eur-lex.europa.eu/HR/legal-content/summary/european-climate-law.html> (pristupljeno 29.10.2023.)
69. EU Emissions Trading System (EU ETS) https://climate.ec.europa.eu/eu-action/eu-emissions-trading-system-eu-ets_en (pristupljeno 28.10.2023.)
70. Direktiva (EU) 2023/2413 Europskog parlamenta i vijeća od 18. listopada 2023. o izmjeni Direktive (EU) 2018/2001, Uredbe (EU) 2018/1999 i Direktive 98/70/EZ u pogledu promicanja energije iz obnovljivih izvora te o stavljanju izvan snage Direktive Vijeća (EU) 2015/652 <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2023/2413/oj> (pristupljeno 15.12.2023.)

71. Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “Dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int* 2003;86(2):412–31. doi: <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
72. Rai PK, Lee SS, Zhang M, Tsang YF, Kim KH. Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environ Int* 2019; 125:365–85. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.067>
73. Vinatoru M, Mason TJ, Calinescu I. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC, Trends Anal Chem* 2017;97:159–78. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>
74. STATGRAPHICS Centurion StatPoint technologies, Inc., VA 20186, USA <https://www.statgraphics.com/> (pristupljeno: 29.10.2023.)
75. Stoscheck CM. [6] Quantitation of protein. *Methods in enzymology*. 1990;182:50–68. doi: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82008-P](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82008-P)
76. AccQ-Tag Ultra derivatization kit. Preuzeto s: <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/application-kits/186003836-accq-tag-ultraderivatization-kit.html> (pristupljeno 16.12.2023.)
77. Christodoulou MC, Orellana Palacios JC, Hesami G, Jafarzadeh S, Lorenzo JM, Domínguez R, et al. Spectrophotometric methods for measurement of antioxidant activity in food and pharmaceuticals. *Antioxidants* 2022; 11(11): 2213. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox11112213>
78. Irvine GB. Determination of molecular size by size-exclusion chromatography (gel filtration). *Curr Protoc in Cell Biol* 2001; 5: 5.5. doi: <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0505s06>
79. SimaPro. Introduction to LCA with SimaPro. Preuzeto s: <https://preustainability.com/legacy/download/SimaPro8IntroductionToLCA.pdf> (pristupljeno: 16.12.2023.)
80. MassLynx softver za spektrometriju mase <https://www.waters.com/nextgen/us/en/products/informatics-and-software/mass-spectrometry-software/masslynx-mass-spectrometry-software.html> (pristupljeno: 25.10. 2023.)

81. Upravitelj aplikacija TargetLynx
https://www.waters.com/waters/library.htm?locale=en_US&lid=1545580
 (pristupljeno: 25.10.2023.)
82. Mæhre HK, Dalheim L, Edvinsen GK, Elvevoll EO, Jensen IJ. Protein determination—method matters. *Foods* 2018;7(1):5. doi: <https://doi.org/10.3390/foods7010005>
83. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;68(5):850–8. doi: <https://10.1021/ac950914h>
84. MALDI-TOF/TOF upute za spektrometar masa, <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mass-spectrometry/maldi-tof.html> (pristupljeno: 25.10. 2023.)
85. UniProt baza podataka, <https://www.uniprot.org/> (pristupljeno 26.02.2021. i 17.04.2023.)
86. Shortle E, O’Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP. Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci* 2014; 98(4):828–34. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>
87. CCaLC baza podataka, <http://www.ccalc.org.uk/contact.php> (pristupljeno: 15.10. 2023.)
88. Djekic I, Petrovic J, Božičković A, Djordjevic V, Tomasevic I. Main environmental impacts associated with production and consumption of milk and yogurt in Serbia – Monte Carlo approach. *Sci Total Environ* 2019;695:133917. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133917>
89. Djekic I, Sanjuán N, Clemente G, Jambrak Režek A, Djukić-Vuković A, Brodnjak UV, et al. Review on environmental models in the food chain - Current status and future perspectives. *J Cleaner Prod* 2018;176:1012–25. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.241>
90. Mekonen S, Ambelu A, Spanoghe P. Effect of household coffee processing on pesticide residues as a means of ensuring consumers’ safety. *J Agric Food Chem* 2015;63(38):8568–73. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03327>
91. Pizzutti IR, de Kok A, Dickow Cardoso C, Reichert B, de Kroon M, Wind W, et al. A multi-residue method for pesticides analysis in green coffee beans using gas

- chromatography–negative chemical ionization mass spectrometry in selective ion monitoring mode. *J Chromatogr A* 2012;1251:16–26. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.06.041>
92. Yang X, Wang J, Xu DC, Qiu JW, Ma Y, Cui J. Simultaneous determination of 69 pesticide residues in coffee by gas chromatography–mass spectrometry. *Food Anal Methods* 2010;4(2):186–95. doi: <https://doi.org/10.1007/s12161-010-9155-3>
 93. Durand N, Gueule D, Gérard Fourny. Contaminants in coffee. *Cah Agric* 2012;21(2-3):192–6. doi: <https://10.1684/agr.2012.0551>
 94. European Food Safety Authority (EFSA). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flutriafol. *Efsa J* 2010; 8, 1868. doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1868>.
 95. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Codex Alimentarius Pesticide Index. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/?tdsourcetag=s_pcqq_aiomsg (pristupljeno: 25.10. 2023.)
 96. European Chemicals Agency (ECHA), Regulation (EU) No 528/2012 Concerning the making available on the market and use of biocidal products, evaluation of active substances, assessment report, piperonyl butoxide product-type 18 (Insecticides, acaricides and products to control other arthropods), January 2017, Greece. <https://echa.europa.eu/documents/10162/a521088e-3a21-2bba-96ad-a1fd55e91325> (pristupljeno: 25.10. 2023.)
 97. Harmoko H, Kartasasmita RE, Tresnawati A. QuEChERS method for the determination of pesticide residues in Indonesian green coffee beans using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Fundam J Math Appl* 2015;47(3):296–308. doi: <https://doi.org/10.5614/j.math.fund.sci.2015.47.3.7>
 98. Jankowska M, Jankowska M, Łozowicka B. Comparison of the effects of water and thermal processing on pesticide removal in selected fruit and vegetables. *J Elementol* 2015;1,2016. doi: <https://10.5601/jelem.2015.20.2.917>
 99. Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy metal toxicity and the environment. *Exp Supplementum* 2014;101(1):133–64. doi: https://10.1007/978-3-7643-8340-4_6

100. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Codex Alimentarius Commission-Geneva 14–18 July 2014. <https://www.fao.org/news/story/en/item/238558/icode/> (pristupljeno 15.10.2023.)
101. European Commission, Arsenic, Arsenic in food. https://food.ec.europa.eu/safety/chemical-safety/contaminants/catalogue/arsenic_en (pristupljeno 15.10.2023.)
102. Hackethal C, Kopp JF, Sarvan I, Schwerdtle T, Lindtner O. Total arsenic and water-soluble arsenic species in foods of the first German total diet study (BfR MEAL Study). *Food Chem* 2021;346:128913. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128913>
103. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of nickel in food and drinking water. *EFSA Journal* 2015;13(2). doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4002> (pristupljeno 15.10.2023.)
104. European Food Safety Authority (EFSA). The 2015 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal* 2017;15(4). doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4791>.
105. Direktiva komisije 2003/40/EZ od 16. svibnja 2003. o određivanju popisa, dopuštenih količina i zahtjeva za deklariranje sastojaka prirodnih mineralnih voda i uvjeta za korištenje zraka obogaćenog ozonom u obradi prirodnih mineralnih voda i izvorskih voda <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32003L0040> (pristupljeno: 25.10. 2023.)
106. Ballesteros LF, Teixeira JA, Mussatto SI. Chemical, functional and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food Bioprocess Technol* 2014;7(12):3493–503. doi:[10.1007/s11947-014-1349-z](https://doi.org/10.1007/s11947-014-1349-z)
107. Zarrinbakhsh N, Wang T, Rodriguez-Urbe A, Misra M, Mohanty AK. Characterization of wastes and coproducts from the coffee industry for composite material production. *BioResources* 2016;11(3). doi: <https://doi.org/10.15376/biores.11.3.7637-7653>
108. Martuscelli M, Esposito L, Di Mattia C, Ricci A, Mastrocola D. Characterization of coffee silver skin as potential food-safe Ingredient. *Foods* 2021;10(6):1367. doi: <https://doi.org/10.3390/foods10061367>

109. Svensson B, Svendsen I, Højrup P, Roepstorff P, Ludvigsen S, Poulsen FM. Primary structure of barwin: a barley seed protein closely related to the C-terminal domain of proteins encoded by wound-induced plant genes. *Biochemistry* 1992;31(37):8767–70. doi: <https://10.1021/bi00152a012>
110. Nzekoue FK, Angeloni S, Navarini L, Angeloni C, Freschi M, Hrelia S, et al. Coffee silverskin extracts: Quantification of 30 bioactive compounds by a new HPLC-MS/MS method and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Food Res Int* 2020;133:109128. doi: <https://10.1016/j.foodres.2020.109128>
111. Franckov godišnji izvještaj iz 2022. godine, <https://www.franck.eu/hr/sve-novosti/franck-objavio-svoje-drugo-izvjesce-o-odrzivosti-za-2020-i-2021/> (pristupljeno: 10.05.2023.)
112. Međuvladin panel o klimatskim promjenama <https://www.ipcc.ch/> (pristupljeno: 25.10. 2023.)
113. Landfill of biodegradable waste, production mix, Environmental Footprint, database: openLCA (pristupljeno: 20.10. 2023.)
114. Guglielmetti A, D'Ignoti V, Ghirardello D, Belviso S, Zeppa G. Optimisation of ultrasound and microwave-assisted extraction of caffeoylquinic acids and caffeine from coffee silverskin using response surface methodology. *Ital J Food Sci* 2017;29(3):409–23. doi: <https://doi.org/10.14674/IJFS-727>
115. Antonetti C, Ciorba S, Licursi D, Raspolli Galletti AM. Optimization Study for Extraction of the value-added compounds polyphenols from the waste biomass coffee silverskin in the perspective of circular economy. 29th European Biomass conference and exhibition, 2021. doi: <https://doi.org/10.5071/29theubce2021-3ao.6.2>
116. Ansanelli G, Fiorentino G, Chifari R, Meisterl K, Leccisi E, Zucaro A. Sustainability assessment of coffee silverskin waste management in the metropolitan city of Naples (Italy): A life cycle perspective. *Sustainability* 2023;15(23):16281. doi: <https://doi.org/10.3390/su152316281>
117. Lorbeer L, Schwarz S, Franke H, Lachenmeier DW. Toxicological assessment of roasted coffee silver skin (*Testa of Coffea sp.*) as novel food ingredient. *Molecules* 2022;27(20):6839. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27206839>
118. Sánchez A, Vázquez A. Bioactive peptides: A review. *J Food Saf* 2017;1, 29–46,

doi: <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx006>

119. Purohit K, Reddy N, Sunna A. Exploring the potential of bioactive peptides: From Natural sources to therapeutics. *Int J Mol Sci* 2024;25(3):1391. doi: <https://10.3390/ijms25031391>
120. Zengin G, Sinan KI, Mahomoodally MF, Angeloni S, Mustafa AM, Vittori S, et al. Chemical composition, antioxidant and enzyme Inhibitory properties of different extracts obtained from spent coffee ground and coffee silverskin. *Foods* 2020;9(6):713. doi: <https://10.3390/foods9060713>
121. Mussatto SI. *Coffee in Health and Disease Prevention*, 1. izd., Academic Press, London, UK, 2015.
122. Nieman DC, Gillitt ND, Knab AM, Shanely RA, Pappan KL, Jin F, et al. Influence of a polyphenol-enriched protein powder on exercise-induced inflammation and oxidative stress in athletes: a randomized trial using a metabolomics approach *PLoS One* 2013;8(8):e72215. doi: <https://10.1371/journal.pone.0072215>
123. Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J. The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. *Front in nutr* 2018;5(87). doi: <https://10.3389/fnut.2018.00087>
124. Vidinamo F, Fawzia S, Karim MA. Effect of drying methods and storage with agro-ecological conditions on phytochemicals and antioxidant activity of fruits: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2020;1–9. doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1816891>
125. Çakmakçı S, Çakmakçı R. Quality and nutritional parameters of food in agri-food production systems. *Foods* 2023;12(2):351. doi: <https://doi.org/10.3390/foods12020351>
126. Zhang C, Guo X, Guo R, Zhu L, Qiu X, Yu X, et al. Insights into the effects of extractable phenolic compounds and Maillard reaction products on the antioxidant activity of roasted wheat flours with different maturities. *Food Chem X* 2023;17:100548–8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100548>
127. Zhu B, Hui T, Li X. Effects of microwave heating on sensory properties and antioxidant activity of maillard reaction products from enzymatic hydrolysate of acetes chinensis. *J Aquat Food Prod Technol* 2023;32(3):304–20. doi: <https://doi.org/10.1080/10498850.2023.2213696>
128. Herrmann M, Mehner E, Egger L, Portmann R, Hammer L, Nemecek T. A

comparative nutritional life cycle assessment of processed and unprocessed soy-based meat and milk alternatives including protein quality adjustment. *Front Sustainable Food Syst* 2024;8. doi: <https://10.3389/fsufs.2024.1413802>

8. POPIS KRATICA

ANOVA - analiza varijanci (engl. *analysis of variance*)

EGK - ekvivalenti galne kiseline (engl. *gallic acid equivalent*)

EU ETS - europski sustav za trgovanje emisijama (engl. *EU emissions trading system*)

GC-MS/MS - plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (engl. *gas chromatography–mass spectrometry*)

GWP – potencijal globalnog zatopljenja (engl. *global warming potential*)

ICP-MS - induktivno spregnuta plazma povezana s masenom spektroskopijom (engl. *inductively coupled plasma mass spectrometry*)

KUP – koncentracija ukupnih proteina (engl. *concentration of total proteins*)

LCA – životni ciklus proizvoda (engl. *life cycle assessment*)

LCIA – utjecaj životnog ciklusa proizvoda (engl. *life cycle impact assessment*)

LC-MS/MS - tekućinska kromatografija sa spektrometrijom masa (engl. *liquid chromatography–mass spectrometry*)

MDK – maksimalna dopuštena koncentracija (engl. *maximum allowed concentration*)

MSR - rezerve za stabilnost tržišta (engl. *market stability reserve*)

MRO – maksimalna razina ostataka (engl. *maximum residue levels*)

MAE - mikrovalna ekstrakcija (engl. *microwave-assisted extraction*)

RSM - metode odazive površine (engl. *response surface methodology*)

SPI - indeks održivosti procesa (engl. *sustainable process index*)

SPK – srebrna pokožica kave (engl. *coffee silverskin*)

UAE – ultrazvučna ekstrakcija (engl. *ultrasound-assisted extraction*)

9. PRILOZI

PRILOG 1: Prikaz pesticida analiziranih GC-MS/MS metodom

	Analit	Vrijeme zadržavanja (min)	Koncentracija (µg/ml)	Iskorištenje
1	Diklobenil	6,86	0,0081±0,0002	0,81±0,02
2	Bifenil	7,77	0,0091±0,0002	0,91±0,02
3	Klormefos	9,20	0,0110±0,0010	1,10±0,10
4	Etridiazol	9,14	0,0074±0,0002	0,74±0,02
5	Krimidin	10,46	0,0087±0,0002	0,87±0,02
6	Kloroneb	10,53	0,0098±0,0001	0,98±0,01
7	Kloretoksifos	13,04	0,0051±0,0002	0,51±0,02
8	Difenilamin	13,25	0,0080±0,0002	0,80±0,02
9	Demeton-S-metil	13,75	0,0100±0,0000	1,00±0,00
10	Etalfluralin	14,03	0,0067±0,0002	0,67±0,02
11	Naled	14,05	0,0087±0,0002	0,87±0,02
12	Sulfotep	14,53	0,0093±0,0002	0,93±0,02
13	Benfluralin	14,60	0,0091±0,0002	0,91±0,02
14	Forat	14,89	0,0097±0,0002	0,97±0,02
15	Alfa-izomer benzenskog heksaklorida (Alfa-BHC)	14,95	0,0087±0,0001	0,87±0,01
16	Heksaklorobenzen	15,06	0,0069±0,0009	0,69±0,09
17	Pentakloroanisol	15,39	0,0087±0,0001	0,87±0,01
18	Etoksikvin	15,95	0,0079±0,0002	0,79±0,02
19	Simazin	15,93	0,0105±0,0005	1,05±0,05
20	Beta-izomer benzenskog heksaklorida (Beta-BHC)	16,26	0,0080±0,0003	0,83±0,03
21	Propazin	16,40	0,0078±0,0002	0,78±0,02
22	Klomazon	16,40	0,0077±0,0002	0,77±0,02
23	Gama-izomer benzenskog heksaklorida (Gama-BHC - lindan)	16,51	0,0091±0,0007	0,91±0,07
24	Terbufos	16,92	0,0081±0,0004	0,81±0,04
25	Terbutilazin	17,06	0,0073±0,0002	0,73±0,02
26	Profluralin	17,04	0,0085±0,0002	0,85±0,02
27	Flukloralin	17,62	0,0087±0,0003	0,87±0,03
28	Delta-izomer benzenskog heksaklorida (Delta-BHC)	17,95	0,0069±0,0001	0,69±0,01

29	Trialat	18,10	0,0082±0,0002	0,82±0,03
30	Teflutrín	18,29	0,0083±0,0002	0,83±0,02
31	Izobenzan	18,59	0,0105±0,0005	1,05±0,05
32	Iprobenfos	18,54	0,0076±0,0000	0,76±0,00
33	Tebupirimfos	18,56	0,0085±0,0003	0,85±0,03
34	Fosfamidon-2	19,11	0,0086±0,0004	0,86±0,04
35	Diklofention	19,27	0,0072±0,0003	0,72±0,03
36	Propanil	19,20	0,0092±0,0003	0,92±0,03
37	Klorpirifos-metil	19,50	0,0088±0,0008	0,88±0,08
38	Vinklozolin	19,76	0,0084±0,0004	0,84±0,04
39	Heptaklor	19,94	0,0090±0,0003	0,90±0,03
40	Simetrin	20,14	0,0048±0,0002	0,48±0,02
41	Propizoklor	20,14	0,0070±0,0004	0,70±0,04
42	Ametrin	20,35	0,0085±0,0000	0,85±0,00
43	Prometrin	20,52	0,0084±0,0002	0,84±0,02
44	Ditiopir	20,66	0,0079±0,0001	0,79±0,01
45	Fenpropidin	20,49	0,0090±0,0001	0,90±0,01
46	Fenitroton	20,97	0,0077±0,0001	0,77±0,01
47	Pirimifos-metil	20,99	0,0071±0,0001	0,71±0,01
48	Terbutrin	21,05	0,0088±0,0001	0,88±0,01
49	Esprokarb	21,33	0,0080±0,0000	0,80±0,01
50	Malation	21,55	0,0079±0,0001	0,79±0,01
51	Tiazopir	21,65	0,0081±0,0001	0,81±0,01
52	Metolaklor	21,59	0,0089±0,0000	0,89±0,01
53	Fention	21,91	0,0078±0,0002	0,78±0,02
54	Klortal-dimetil	21,91	0,0085±0,0002	0,85±0,02
55	Fenson	22,50	0,0077±0,0002	0,77±0,02
56	Bromofos	22,64	0,0079±0,0001	0,79±0,01
57	Butralin	22,64	0,0090±0,0000	0,90±0,00
58	Nitrotal-izopropil	22,66	0,0087±0,0002	0,87±0,02
59	Pirimifos etil	22,94	0,0085±0,0001	0,85±0,01
60	Izofenfos-metil	23,07	0,0088±0,0001	0,88±0,01
61	Izopropalin	23,11	0,0081±0,0001	0,81±0,01
62	Penkonazol	23,52	0,0099±0,0001	0,99±0,01
63	Tolilfluanid	23,73	0,0065±0,0003	0,65±0,03
64	Ciprodinil	23,70	0,0067±0,0002	0,67±0,02
65	(Z) -pirifenoks	23,67	0,0087±0,0000	0,87±0,00
66	Klozolinat	23,70	0,0057±0,0002	0,57±0,02
67	Bromfeninfos-metil	23,74	0,0088±0,0003	0,88±0,03
68	Izofenfos	23,72	0,0078±0,0000	0,78±0,00
69	(E)-Klorfenvinfos	23,80	0,0089±0,0000	0,89±0,01
70	Fentoat	23,93	0,0095±0,0001	0,95±0,01
71	Dimepiperat	24,00	0,0094±0,0002	0,94±0,02

72	Procimidon	24,08	0,0085±0,0001	0,85±0,01
73	Beflubutamid	24,15	0,0088±0,0001	0,88±0,01
74	Bromofos-etil	24,50	0,0079±0,0003	0,79±0,03
75	1,1-dikloro-2-(o-klorofenil)-2-(p-klorofenil)etilen (o,p'-DDE)	24,61	0,0077±0,0002	0,77±0,02
76	Propafos	24,75	0,0082±0,0002	0,82±0,03
77	Tetraklorvinfos	24,81	0,0089±0,0002	0,89±0,02
78	Trans-klordan	24,89	0,0078±0,0000	0,78±0,00
79	Cis-klordan	24,89	0,0079±0,0001	0,79±0,01
80	Napropamid	25,02	0,0087±0,0002	0,87±0,02
81	Jodofenos	25,38	0,0088±0,0001	0,88±0,01
82	Protiofos	25,56	0,0083±0,0003	0,83±0,03
83	Profenofos	25,73	0,0078±0,0000	0,78±0,00
84	p,p'-DDE	25,83	0,0079±0,0001	0,79±0,01
85	Tribufos	26,01	0,0091±0,0001	0,91±0,01
86	o,p'-DDD	26,03	0,0087±0,0003	0,87±0,03
87	Oksadiazon	26,01	0,0110±0,0000	1,10±0,00
88	Diklobutrazol	26,14	0,0073±0,0013	0,73±0,13
89	Endrin	26,52	0,0069±0,0012	0,69±0,12
90	Ciflufenamid	26,59	0,0063±0,0001	0,63±0,01
91	Klorobenzilat	26,96	0,0079±0,0009	0,79±0,09
92	Kloropropilat	26,97	0,0078±0,0003	0,78±0,03
93	Dinikonazol	27,07	0,0098±0,0001	0,98±0,01
94	1,1,1-trikloro-2-(o-klorofenil)-2-(p-klorofenil)etan (o,p'-DDT)	27,20	0,0085±0,0005	0,85±0,05
95	1,1-dikloro-2,2-bis (p-klorofenil)etan (p,p'-DDD)	27,20	0,0079±0,0000	0,79±0,00
96	Etion	27,26	0,0081±0,0001	0,81±0,01
97	Klortiofos-2	27,35	0,0080±0,0010	0,80±0,10
98	Klortiofos-3	27,35	0,0078±0,0008	0,78±0,08
99	Sulprofos	27,72	0,0058±0,0004	0,58±0,04
100	Karbofenotion	27,99	0,0089±0,0004	0,89±0,03
101	Edifenfos	28,05	0,0084±0,0002	0,84±0,02
102	Kvinoksifen	28,13	0,0083±0,0002	0,83±0,02
103	Endosulfan sulfat	28,13	0,0083±0,0007	0,83±0,07
104	Piraflufen-etil	28,45	0,0073±0,0001	0,73±0,01
105	Diklofop-metil	28,82	0,0080±0,0020	0,80±0,20
106	Diflufenikan	28,91	0,0083±0,0007	0,83±0,07
107	Piributikarb	29,31	0,0067±0,0007	0,67±0,07
108	Iprodion	29,52	0,0073±0,0013	0,73±0,13

109	Bromopropilat	29,74	0,0078±0,0002	0,78±0,02
110	Bifenoks	30,16	0,0079±0,0001	0,79±0,01
111	Tetradifon	30,40	0,0056±0,0006	0,56±0,06
112	Fenotrin-1	30,42	0,0084±0,0002	0,84±0,02
113	Leptofos	30,58	0,0089±0,0002	0,89±0,02
114	Fenotrin-2	30,42	0,0076±0,0006	0,76±0,06
115	Cihalofof-butil	30,94	0,0083±0,0003	0,83±0,03
116	Akrinatri-1	31,21	0,0089±0,0005	0,89±0,05
117	Mireks	31,04	0,0084±0,0002	0,84±0,02
118	Lambda-cihalotrin	31,21	0,0089±0,0009	0,89±0,09
119	Fenarimol	31,30	0,0082±0,0003	0,82±0,03
120	Pirazofos	31,34	0,0130±0,0020	1,30±0,20
121	Akrinatri-2	31,50	0,0072±0,0003	0,72±0,03
122	Dialifos	31,57	0,0100±0,0000	1,00±0,00
123	Piraklofos	31,74	0,0115±0,0005	1,15±0,05
124	Permetrin-1	32,19	0,0060±0,0006	0,60±0,06
125	Flukvinkonazol	32,33	0,0079±0,0002	0,79±0,02
126	Kafenstrol	32,76	0,0067±0,0003	0,67±0,03
127	Flumioksazin	34,42	0,0111±0,0001	1,11±0,01
128	Fluvalinat-2	34,74	0,0083±0,0003	0,83±0,03

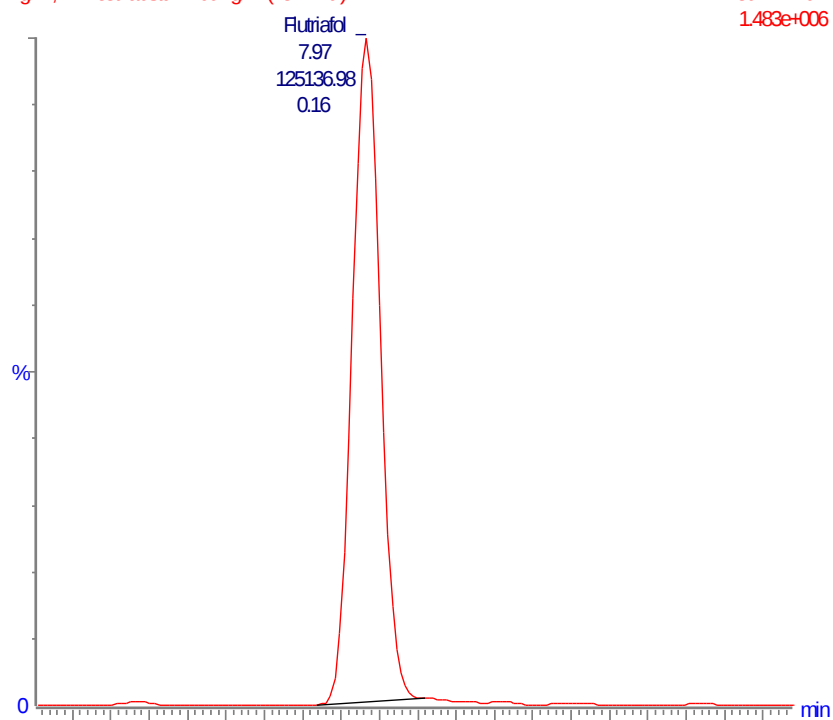
PRILOG 2: Prikaz pesticida analiziranih LC-MS/MS metodom (5 s najmanjim i 5 s najvećim vremenom zadržavanja)

	Analit	Vrijeme zadržavanja (min)	Podudaranje matrica	Standard	Iskorištenje
1	Metamidofos	3,52	25814,30±3911,65	21883,07±669,89	0,85±0,03
2	Acefat	3,97	19103,94±813,07	15727,00±238,56	0,82±0,01
3	Ometoat	4,21	44348,15±300,42	38302,00±61,86	0,86±0,00
4	Dinotefuran	4,31	27244,03±1656,96	22280,44±704,63	0,82±0,03
5	Butoksikarboksime	4,42	10950,54±833,65	9728,59±896,15	0,89±0,08
6	Spirodiklofen	16,00	10361,31±461,09	10301,52±232,05	0,99±0,02
7	Klorfluazuron	16,01	6242,71±234,59	5522,02±621,00	0,88±0,10
8	Piridaben	16,33	88078,37±3594,27	79037,82±3294,35	0,90±0,04
9	Fenazakvin	16,41	80193,47±99527	72394,18±797,29	0,90±0,01
10	Spinetoram	16,51	54974,63±1307,35	53126,81±927,55	0,97±0,02

PRIOLOG 3: Kromatogramski prikazi pesticida flutriafol

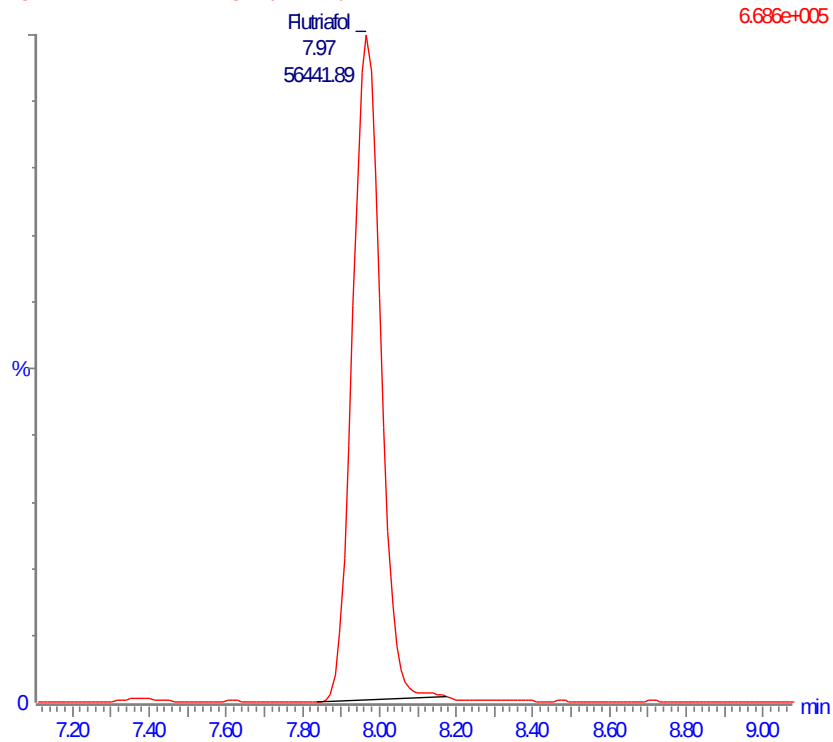
20210120_mix_Pesticidi_001.SMOOTH(Mn,2x2)
1 ng/ml, mixPestLabStd iz 100 ng/ml (28.12.20.)

F113:MRM of 2 channels, ES+
302.1 > 70.2
1.483e+006



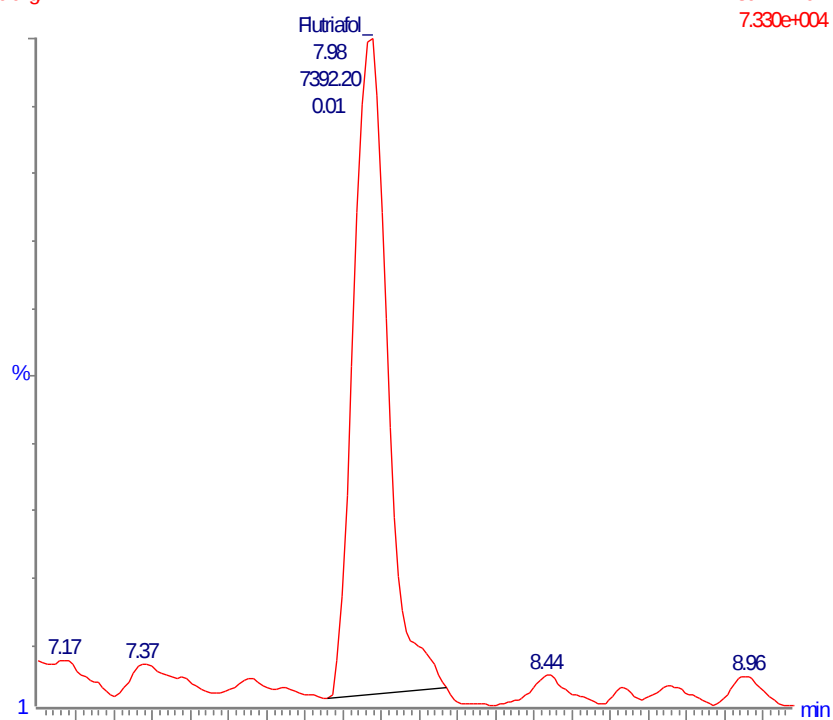
20210120_mix_Pesticidi_001.SMOOTH(Mn,2x2)
1 ng/ml, mixPestLabStd iz 100 ng/ml (28.12.20.)

F113:MRM of 2 channels, ES+
302.1 > 123.1
6.686e+005



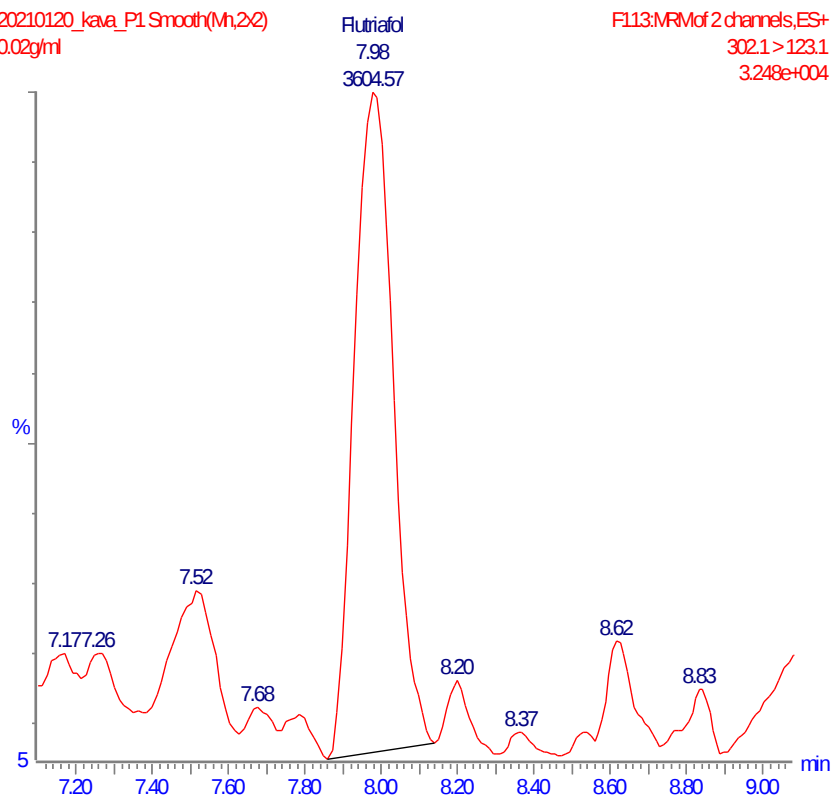
20210120_kava_P1.Smooth(Mn,2x2)
0.02g/ml

Fl13:MRM of 2 channels,ES+
302.1 > 70.2
7.330e+004



20210120_kava_P1.Smooth(Mn,2x2)
0.02g/ml

Fl13:MRM of 2 channels,ES+
302.1 > 123.1
3.248e+004



PRILOG 4: Izvorni znanstveni rad

Biondić Fučkar V, Božić A, Jukić A, Krivohlavek A, Jurak G, Tot A, et al. Coffee Silver Skin—Health safety, nutritional value and microwave extraction of proteins. Foods 2023;12,518. doi: <https://doi.org/10.3390/foods12030518>

PRILOG 5: Izvorni znanstveni rad

Biondić Fučkar V, Nutrizio M, Grudenić A, Djekić I, Režek Jambrak A. Sustainable ultrasound assisted extractions and valorization of Coffee Silver Skin (CS). Sustainability 2023;15,8198. doi: <https://doi.org/10.3390/su15108198>

Article

Coffee Silver Skin—Health Safety, Nutritional Value, and Microwave Extraction of Proteins

Vedran Biondić Fučkar ¹, Angela Božić ², Anita Jukić ², Adela Krivohlavek ³, Gordana Jurak ³, Ana Tot ³, Sonja Serdar ³, Irena Žuntar ^{1,*} and Anet Režek Jambrak ^{2,*}

¹ Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia

² Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia

³ Andrija Štampar Teaching Institute of Public Health, 10000 Zagreb, Croatia

* Correspondence: irena.zuntar@pharma.unizg.hr (I.Ž.); anet.rezek.jambrak@pbf.hr (A.R.J.)

Abstract: The aim of this research was to evaluate the health safety (concentrations of pesticide residues and heavy metals) and nutritional parameters (macro- and microminerals and crude fibre) of coffee silver skin (CS), as well as to isolate proteins from this by-product using an optimised microwave extraction method. The CS by-product samples showed the highest amount of potassium, followed by calcium, magnesium, and sodium. Iron was found in the highest quantity among the microminerals, followed by copper, manganese, zinc, and chromium. The CS sample showed a large amount of fibre and a moderate quantity of proteins obtained by the optimised microwave extraction method. Four heavy metals (nickel, lead, arsenic, and cadmium) were detected, and all were under the permitted levels. Among the 265 analysed pesticides, only three showed small quantity. The results for the proteins extracted by microwave showed that the total protein concentration values ranged from 0.52 ± 0.01 mg/L to 0.77 ± 0.07 mg/L. The highest value of the concentration of total proteins (0.77 ± 0.07 mg/L) was found in the sample treated for 9 min, using a power of 200 W. Based on these results, it can be concluded that CS is a healthy and nutritionally rich nutraceutical that could be used in the production of new products in the food industry and other industries.

Keywords: coffee silver skin (CS); health safety; nutraceutical; pesticides; heavy metals; fibre; proteins; microwave extraction; food industry



Citation: Biondić Fučkar, V.; Božić, A.; Jukić, A.; Krivohlavek, A.; Jurak, G.; Tot, A.; Serdar, S.; Žuntar, I.; Režek Jambrak, A. Coffee Silver Skin—Health Safety, Nutritional Value, and Microwave Extraction of Proteins. *Foods* **2023**, *12*, 518. <https://doi.org/10.3390/foods12030518>

Academic Editor: Elsa M. Gonçalves

Received: 27 November 2022

Revised: 9 January 2023

Accepted: 18 January 2023

Published: 23 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Coffee silver skin (CS) is a thin tegument that directly covers the coffee seed. It consists of various components that can be used and treated in reprocessing. It is known that CS is a high-volume by-product of coffee roasting [1]. As a healthy raw material, it could be used in the production of new food products, for the purpose of enriching existing or new food products, or as a dietary supplement, functional food, and/or nutraceutical.

The major component in CS is dietary fibre (up to 68.5%), which includes two types of fibres: insoluble (46–56%) and soluble (8.2–11%) fibres [2–8]. Dietary fibre is one of the main nutritional factors contributing to human well-being. The European Food Safety Authority (EFSA) defines dietary fibres as non-digestible carbohydrates, including non-starch polysaccharides, resistant starch, oligosaccharides, and lignin [9]. Diets in the Western world are impoverished of fibres that have important beneficial physiological effects and are associated with the risk of non-communicable chronic diseases [10]. In the large intestine, dietary fibre is fermented by the microbiota, leading to the generation of short-chain fatty acids (SCFAs) that also contribute to human well-being. The high dietary fibre content of CS might benefit the intestine and gut microbiota, as well as overall health [11].

The second major component present in CS is protein (7.1–22%), followed by carbohydrates (9.5–14.5%) and fat (1.6–3%) [2–6,12–15]. CS is also a source of polyphenols, particularly chlorogenic acid (CGA) of which 5-O-, 3-O-, and 4-O-caffeoylquinic acids are

the most relevant. This by-product also contains caffeine (1%) and melanoidins (5%) which are formed during the roasting process. The CS mineral composition consists mainly of potassium, magnesium, and calcium (about 5 g, 2 g, and 0.5 g per 100 g of silver skin). In addition to potassium, magnesium, and calcium, various other minerals, such as iron, manganese, copper, phosphorus, and aluminium, can be found in CS [5,7,8,16,17]. Recently, Lorbeer et al. calculated that 26 g of estimated daily intake of CS contained 32% of daily dose for potassium, 14–40% for magnesium, 13–26% for calcium, 50–200% for iron, and around 5% for zinc [8]. In addition, 1/12 of daily reference dose of vitamin E and less than 1% of daily dose of vitamins B2 and B3 were found in 26 g of estimated daily dose of SC [8].

Pesticide and heavy metal residue monitoring should be performed when CS samples are examined from a food safety standpoint to effectively protect consumer health. Some metals are harmful even at low concentrations, and they also accumulate in tissues over time [18]. Since the Earth's origin, heavy metals have been found naturally on the Earth's crust. The prime cause of heavy metal pollution in both terrestrial and aquatic environments is anthropogenic activity (metal mining, smelting, foundries, and other metal-based industries, as well as leaching of metals from different sources, such as landfills, waste dumps, excretion, livestock and chicken manure, runoffs, automobiles and roadworks), and the second cause is their use in the agricultural field (pesticides, insecticides, fertilisers, etc.) [19–22]. Additionally, studies showed that various pesticide residues have been found in coffee beans that expose consumers to dangerous agrochemicals [22–25]. Among pesticides and heavy metals are other contaminants such as 5-hydroxymethylfurfural, which is produced by the thermal decomposition of carbohydrates and suspected to be a genotoxic and carcinogenic agent. Polycyclic aromatic hydrocarbons, acrylamide, and phytosterol oxidation products were also detected but in low amount or only in traces [8].

One of the effective and environmentally friendly methods of extracting components from CS is microwave extraction (MW). The advantages of MW are shorter extraction time, faster heating, lower temperature gradient, and reduced use of solvents. The reduced use of solvents and the possibility of using water as a solvent make this method more environmentally friendly than the classic methods of extracting components from plant materials. Microwave-assisted extraction (MW) is a non-invasive, relatively new method of extracting bioactive components, mainly from plant materials [26]. Microwave extraction is highly dependent on the dielectric properties of the solvent and the sample, the solubility of the sample in the solvent, and the temperature of the process. Water and polar solvents that have a higher dielectric constant are mainly used for microwave extraction [27]. In addition to the dielectric constant, an important factor when choosing a solvent is the scattering factor, which shows the efficiency of the conversion of electromagnetic energy into heat [28]. Water has a higher dielectric constant than polar solvents, such as ethanol and methanol, but has a lower scattering factor. For this reason, a mixture of an organic solvent and water can be used for microwave extraction to obtain a solvent with a higher dielectric constant and a more significant scattering factor. In addition to the solvent, an important parameter for microwave extraction is temperature. A higher extraction temperature generally improves the extraction performance; however, too high a temperature can adversely affect the thermolabile components in the sample. Microwave extraction can be performed in a closed or open system. In closed systems, the extraction takes place in a closed vessel with uniform microwave heating, where it is preferable that the system is designed so that there is the possibility of pressure and temperature control. This type of system can achieve higher temperatures and, thus, more efficient extraction thanks to the creation of increased pressure in the vessel, which increases the evaporation point of the solvent [29]. However, in such a system, the possibility of treating many samples simultaneously is mostly limited. Open MW systems may be more suitable for thermolabile compounds, such as bioactive components from plant materials.

The purpose of this article is to evaluate the health safety and nutritional value of CS, the most abundant by-product of roasting coffee. The aim is to analyse the concentration of valuable macro- and microminerals and crude fibres, to isolate proteins from the CS

samples using an optimised MW method, and to provide a protein analysis as well as determine the concentration of pesticide residues and heavy metals.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

A sample of the by-products after coffee roasting, i.e., CS sample, was used in his research. The sample was obtained from a Croatian company involved in the production of coffee, tea, and snack products from Zagreb, Franck Ltd. The studied sample contains a mixture of *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta) coffee, since the plant collects the by-products from all roasters, which are then converted into pellets. The sample of by-products was obtained in the form of pellets which were ground into powder for research purposes to facilitate the analysis. Before analysis, the pellets were grinded and homogenised. Each analysis was performed in six parallel probes.

2.2. Chemicals

The following chemicals were used in this research: acetone (Lach-Ner, Neratovice, Czech Republic); acetonitrile (Applichem, Darmstadt, Germany); ammonium formate (GramMol, Zagreb, Croatia); argon, 99.9995% (Messer, Bad Soden am Taunus, Germany), certified element reference material (CPAChem, Bogomilovo, Bulgaria); distilled water and nitric acid (Gram-Mol, Zagreb, Croatia); helium, 6.0 (Messer, Bad Soden am Taunus, Germany); methanol (GramMol, Zagreb, Croatia); mixture of magnesium sulphate, sodium chloride, and citrate salts (Citrates-Kit-01, BEKOlut, Bruchmühlbach-Miesau, Germany); mixture of magnesium sulphate salt, primary secondary amine, and GCB (PSA-Kit-06, BEKOlut, Bruchmühlbach-Miesau, Germany); sodium hydroxide (T.T.T., Sveta Nedjelja, Croatia); petrol ether (Applichem, Chicago, IL, USA); sulfuric acid (Chemistry, Zagreb, Croatia); and hydrogen peroxide (Gram-Mol, Zagreb, Croatia).

2.3. Methods for Determination of Target Compounds in CS Sample

2.3.1. Determination of Pesticide Residues

The pesticide residue samples were prepared by using the Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe method (QuEChERS) according to Anastassiades et al. [30]. After that, they were quantified by gas or liquid chromatography coupled to a triple quadrupole (QQQ) mass spectrometry (GC-MS/MS, LC-MS/MS). In brief, the prepared samples were injected and analysed on both instruments to determine as many pesticides as possible. The samples analysed by the gas chromatography (GCMS-TQ8050 NX, Nexis GC-2030, Shimadzu, Kyoto, Japan) were recorded in GC-MS Solution and the data were processed in LabSolutions Insight GCMS. The samples analysed by the liquid chromatography (UPLC-MS/MS, Xevo TQ MS, Waters, Milford, CT, USA) were recorded in MassLynx, and the data were processed in TargetLynxXS. The chromatographic conditions under which the gas and liquid chromatography measurements were performed are shown in Table 1. The obtained chromatograms were analysed based on the retention time (RT) of the components in the sample and the standard, and the individual pesticides in the samples were qualitatively identified by using two-ion transitions for LC-MS/MS determination and three-ion transitions for the MRM of each pesticide for GC-MS/MS determination. The ratio of the area below the peak in the sample and the individual standard provide the quantitative information, i.e., the concentration of pesticides which are present in the sample [31].

Table 1. Chromatographic conditions of GC-MS/MS and LC-MS/MS.

	GC-MS/MS	LC-MS/MS
Instrument	GCMS-TQ8050 NX, Nexis GC-2030, Shimadzu	UPLC-MS/MS, Xevo TQ MS, Waters
Column	SH-Rxi-5Sil MS 30 m, 0.25 mmID; 0.25 μ m df, Restek	ACQUITY UPLC BEH 150 $\times$ 2.1 mm; 1.7 μ m, Waters
Mobile phase	He	A: 5 mM ammonium formate in a mixture of water and methanol (9:1) B: 5 mM ammonium formate in methanol
Flow	1.4 mL/min	0.4 mL/min
Temperature of columns	105–290 $^{\circ}$ C	50 $^{\circ}$ C
Temperature of injectors	290 $^{\circ}$ C	10 $^{\circ}$ C
Temperature of ion source	250 $^{\circ}$ C	150 $^{\circ}$ C
Injection volume	1.0 μ L	30 μ L
Total run time	40 min	21 min

2.3.2. Determination of Valuable Minerals and Heavy Metals

The CS sample was first degraded and prepared for measurement and then measured on an inductively coupled plasma instrument with a mass spectrometer as a detector (ICP-MS) [32]. Briefly, 0.5 g of the crushed and homogenised CS sample was first weighed into the Teflon cuvette of the microwave device. Then, 1 mL of water was added to the sample, weighed, and left for 1 h. After that, 3 mL of concentrated nitric acid and 1 mL of 30% hydrogen peroxide were added. The cuvette with the sample was closed and placed in a microwave decomposition drum (ultraWAVE, Milestone, Sorisole, Italy). Upon the completion of the decomposition procedure, the sample was cooled, the cuvette was opened, and the clear solution was poured through a glass funnel and quantitatively transferred to a 25 mL volumetric flask while being rinsed with deionized water. The sample was prepared and ready for measurement when it was without suspended particles. Firstly, a calibration curve with 3 standard solutions was made, after which the measurement of the samples was conducted. All the samples were prepared and analysed in two parallels. An inductively coupled plasma with a mass detector (ICP-MS 7900, Agilent, Santa Clara, CA, USA) and an autosampler (according to the conditions in Table 2) was used. Inert gases were used for the operation of the instrument: argon with a purity of 99.9995% and helium with a purity of 6.0. Individual standards were used to prepare the calibration curves. A linearity of ≥ 0.999 was achieved for the calibration curve of each element. An internal standard (Bi, Sc, Y, Ge) with a concentration of 100 μ g/L was used.

Table 2. Chromatographic conditions of ICP-MS.

Atomiser	MicroMist
Injector	quartz
Cones	Nical
Rf-power	1180 W
Plasma gas flow	15.0 L/min
Atomiser gas flow	1.07 L/min
Auxiliary gas flow	0.90 L/min
Integration time	1000 ms
Points per spade	100
Number of replicas	5

2.3.3. Determination of Nutritional Value of CS Dietary Fibre (CSDF)

The determination of crude fibre in this study was determined using the method for the determination of the mass fraction of crude fibre in food from AOAC 962.09 [33]. Crude fibre is defined as the residue after the process of decomposition, drying, and incineration of a sample.

The CS samples (6 parallel probes) were tested in six parallels by first weighing 0.95–1.00 g of each sample into labelled filter bags. This should be performed very carefully so as not to catch the sample above the part of the bag that would be welded later by means of a welding device at about 4 mm from its top. It was also necessary to weigh one empty bag that would serve as a blank. All the samples were placed in a beaker and poured over with petroleum ether to extract the fat. The overflowing bags were left to stand for 10 min and then they were dried in a desiccator. The bags were shaking to evenly distribute the sample over the bag and to break up lumps. The bags were fitted in a frame and placed in a raw fibre analytical device (Ankom 2000, Ankom, Macedon, NY, USA). After decomposition in the raw fibre analytical device, the bags were cool, and excess water was carefully squeezed out of the bags. The bags were immersed in acetone and left to stand for 3–5 min, after which they were dried. When they were completely dry, they were placed in the oven at 102 ± 2 °C for 2–4 h. After drying, they were cooled and weighed. The ash was then determined by incineration in weighed porcelain pots at 600 ± 15 °C for 2 h. After cooling, it was weighed again. The calculation of raw fibres is performed according to the following equations:

$$C_1 = \frac{m(\text{bag after drying}) - m(\text{ash})}{m(\text{bag})}$$

$$m(\text{ash}) = m(\text{pot after annealing}) - m(\text{pot})$$

$$w(\text{fibers}) = \frac{\{[m(\text{nafter drying}) - m(\text{ash})] - [m(\text{bag}) \times C_1]\}}{m(\text{sample})} \times 100$$

2.3.4. Microwave Extraction of Total Proteins—Impact on Total Protein's Proportion

Microwave extraction (MW) is a non-invasive, relatively new method for extracting bioactive components, mainly from plant materials as described previously [27–29]. Microwave extraction of the CS samples was carried out using deionized water as a solvent. The extraction was performed on a microwave laboratory synthesis device StartSYNTH (Milestone, Italy). Before the extraction, the design of the experiment was created in the program STATGRAPHICS Centurion (StatPoint technologies, Inc., Warrenton, VA 20186, USA). After the extraction, the obtained results were processed in the same program. Using STATGRAPHICS, an analysis of variance (ANOVA) was performed, which determined the statistical significance of power and time parameters on the values of total proteins and polyphenols. Those parameters which p -value < 0.05 were taken as statistically significant parameters. Diagrams of the response surfaces of the experimental data and the equations of the experimental models were also created. Extraction optimisation was also carried out, in which the optimal extraction parameters were determined.

The determination of protein concentration by the Lowry method [34] was carried out spectrophotometrically. From a standard protein solution with a concentration of 200 mg/mL, solutions of known protein concentrations of 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, and 0.12 mg/L were prepared in a 10 mL volumetric flask. After measuring the absorbance, a calibration diagram was created.

3. Results

3.1. Pesticide Residues

In this work, we attempted to analyse pesticide residues in CS by analysing as many active substances as possible (635 active substances on LC-MS/MS or GC-MS/MS). A total of 265 pesticides passed the validation experiments in accordance with the guidance SANTE/12682/2019, and their linearity, repeatability, reproducibility, and utilization of the extraction procedure were tested. In total, 265 pesticides were successfully analysed in the CS samples. Pesticide residues were determined by LC-MS/MS and/or GC-MS/MS. The main reason is that these technologies are not equally sensitive to all pesticides. Our goal was to test as many pesticides as we could, but due to the heavy matrix in the CS samples and the suppressions of ions, 128 pesticides were successfully quantified by GC-MS/MS and 137 pesticides by LC-MS/MS. Table 3 shows three pesticides which have been detected and quantified in a CS sample. The detected and quantified pesticides are

flutriafol, imidacloprid, and piperonyl butoxide. The results are presented as the average of six parallel analyses.

Table 3. Concentration of detected pesticides in a CS sample.

No.	Pesticide	Concentration (mg/kg)
1	Flutriafol	0.012 ± 0.006
2	Imidacloprid	0.016 ± 0.008
3	Piperonyl butoxide	0.002 ± 0.001

3.2. Valuable Minerals and Heavy Metals

The ICP-MS determined various metals that were classified into the categories of macrominerals, microminerals and heavy metals. Macrominerals are considered substances that the human body needs in large quantities, unlike microminerals that are present in the body in small quantities; macrominerals are essential for a vast array of physiological functions, as well as for normal growth and development. In our CS sample, potassium was found in the highest amount (K; $24,311 \pm 764$ mg/kg), followed by calcium (Ca; $10,569 \pm 210$ mg/kg), magnesium (Mg; 4672.5 ± 88.5), and sodium (Na; 329 ± 79 mg/kg). Among the microminerals, the CS sample contained iron (Fe) in the highest quantity (567.50 ± 12.50 mg/kg), followed by copper (Cu; 74.90 ± 0.60 mg/kg), manganese (Mn; 37.55 ± 0.45 mg/kg), zinc (Zn; 16.80 ± 0.70 mg/kg), and chromium (Cr; 1.53 ± 0.04 mg/kg). Heavy metals are a group of metals with a density greater than 5 g/cm^3 [19], so this group includes a list of metals, including some microminerals which are categorized into a separate group in this paper. Due to their persistence, high toxicity, and tendency to accumulate in the ecosystem, heavy metals are dangerous for living organisms [35]. Four heavy metals, including nickel, lead, arsenic, and cadmium, were detected in a CS sample and are shown in Table 4. The results are presented as the average of six parallel analyses.

Table 4. Concentration of detected heavy metals in a CS sample.

No.	Heavy Metal	Concentration (mg/kg)
1	Nickel (Ni)	2.495 ± 0.055
2	Lead (Pb)	0.249 ± 0.077
3	Arsenic (As)	0.107 ± 0.018
4	Cadmium (Cd)	0.106 ± 0.002

3.3. Dietary Crude Fibres

Crude fibre is only a part of the dietary fibres, more precisely the part of insoluble fibres that remain after laboratory treatment with acid and alkali. This group mainly includes cellulose, hemicellulose, and lignin. Food contains more dietary fibre than crude fibre, but there is no quantitative relationship between these two types of fibres [36]. In the studied CS sample, 31.97 ± 0.61 g/100 g of crude fibres was detected. Given that it is only part of the insoluble fibre, the total fibre is much more. The representation of fibres in the sample is uniform. Considering the large amount of fibre, the skin of the coffee bean has great potential to be used as a raw material in the development of functional food. The results are presented as the average of six parallel analyses.

3.4. Microwave Extraction (MW) Conditions—Impact on the Proportion of Total Proteins in the Samples

Total protein concentration values range from 0.52 ± 0.01 mg/L to 0.77 ± 0.07 mg/L (Table 5). The highest value of the concentration of total proteins (0.77 ± 0.07 mg/L which is 0.77 mg/L i.e., 0.007%) was found in the sample M9, which was treated for 9 min with a microwave power of 200 W. Such a result is expected since it is the sample that was treated for the longest time (9 min) with the highest applied microwave power (200 W). The second-best result of protein concentration (0.69 ± 0.01 mg/L) was obtained

for the sample M6, which was treated with a power of 150 W for 9 min. A similar value of 0.66 ± 0.06 mg/L was obtained for the sample M8 treated for 6 min, with a power of 200 W. Other samples showed lower values of total protein concentrations, ranging from 0.52 ± 0.01 mg/L (M2) to 0.59 ± 0.01 mg/L (M7). The three samples treated with 100 W of microwave power showed almost equal total protein concentrations of 0.52 ± 0.01 mg/L (M2), 0.52 ± 0.08 mg/L (M3), and 0.53 ± 0.00 mg/L (M1), respectively. This means that when using low microwave power, prolonging the extraction time does not significantly increase the proportion of extracted proteins. The results are presented as the average of six parallel analyses.

Table 5. Total protein concentration (mg/L $\pm$ sd) in a CS sample treated with microwave power.

Samples	Treatment Time [min]	Power [W]	Total Proteins [mg/L $\pm$ sd]
M1	3	100	0.53 ± 0.00
M2	6	100	0.52 ± 0.01
M3	9	100	0.52 ± 0.08
M4	3	150	0.57 ± 0.00
M5	6	150	0.59 ± 0.16
M6	9	150	0.69 ± 0.01
M7	3	200	0.59 ± 0.01
M8	6	200	0.66 ± 0.06
M9	9	200	0.77 ± 0.07

To test the statistical significance of each factor of MW, an analysis of variance (ANOVA) was performed by comparing the mean square value with the experimental error estimate. The results are shown in Table 6. Three factors, including microwave power (A), extraction time (B), and their interactions (AB), have a p -value < 0.05 , which means that these three factors have a significant effect on the change in the proportion of total proteins. This is important because it shows that when optimising the process and planning future experiments, we must consider the microwave power and the extraction time because both factors significantly affect the concentration of total proteins in the extract. The R-squared value is 98.901%, which means that 98.901% of the variability of the total protein concentration results can be explained by the experiment being set up in this way.

Table 6. Results of the test of statistical significance (ANOVA) of each factor of microwave extraction (MW) on the change in the concentration of total proteins.

Source	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	F-Ratio	p-Value
A: Power	0.0345649	1	0.0345649	158.04	0.0011
B: Time	0.0139394	1	0.0139394	63.74	0.0041
AA	0.000701876	1	0.000701876	3.21	0.0711
AB	0.00897756	1	0.00897756	41.05	0.0077
BB	0.000862509	1	0.000862509	3.94	0.0412
Total error	0.000656115	3	0.000218705	/	/
Total error (updated)	0.0597024	8	/	/	/

R-square = 98.901%; R-square (updated for degrees of freedom) = 97.0694%; Standard deviation, estimated = 0.0147887; Standard absolute deviation = 0.00693025; Durbin-Watson statistic = 1.63376 ($p = 0.1962$); Lag 1 residual autocorrelation = 0.162683.

Additionally, the effects of power and time on the proportion of total proteins during the microwave extraction procedure is tested statistically and presented by a counter plot (Figure 1).

The diagram in Figure 1 gives a graphic overview of the statistical processing. It is evident that both microwave power and extraction time have an influence on the concentration of total proteins. In the contour diagram, the highest concentration values of total proteins are in the upper right corner. Such displays of response surfaces give us the possibility of easier process planning and prediction of future measurements, because

relatively small changes in the concentration of total proteins with changes in microwave power and extraction time are shown.

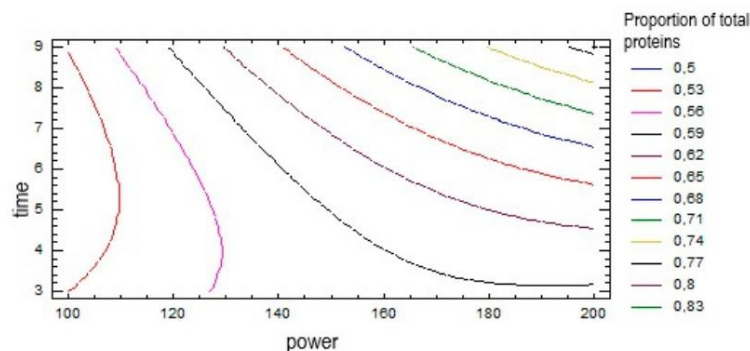


Figure 1. Contour plot of response surfaces for total protein concentration.

4. Discussion

Our study provides data on the chemical characteristics of CS, especially those that pose an impact on human health. It is known that residual pesticides and heavy metals (Tables 3 and 4) may affect human health; thus, their concentrations must be checked and measured to validate the compliance of products for human consumption.

The results of the analysis of pesticide residues and heavy metals in our study showed that the CS samples are safe for human consumption and, thus, can be used as ingredient for other products, such as functional foods, food supplements and cosmetics. All pesticides are below the maximum permitted level of pesticide residues in food and the studied CS does not pose a risk to human health. The detected pesticide flutriafol (Table 3) is a contact and systemic fungicide belonging to the triazole class. It is used on various cereals and for seed treatment. Its mechanism of action is inhibition of ergosterol biosynthesis and, thus, disruption of fungal cell wall synthesis [37]. Imidacloprid (Table 3) belongs to a group of neonicotinoid/nitroguanidine compounds used as insecticides. It acts as an antagonist by binding to postsynaptic nicotinic receptors in the central nervous system of insects. It is widely used on almost all crops [38]. Piperonyl butoxide (Table 3) has been used in insecticidal formulations for more than 50 years and always in combination with other insecticides, such as pyrethrins, synthetic pyrethroids, organophosphates, and carbamates. Piperonyl butoxide itself is not an insecticide, but it is a very good synergist and enhances its action when in combination with other insecticides. It allows more toxins to reach the target molecule, which increases the mortality of the target organism [39]. Finally, when comparing the results of research on coffee beans and research on the CS [40] and the results obtained in this study, it shows that the by-product of coffee contains much less pesticides and in very small quantities. The reason for this is that the coffee bean undergoes a process of roasting at high temperatures before commercialisation, which leads to the decomposition of pesticides [41]. Additionally, Nolasco et al. [17] in their research on three classes of SC samples (two main varieties of SC obtained by roasting *Coffea arabica* and *Coffea robusta* green beans and their blend) found that all values detected were at <LOQ. They related these results to the botanical differences between the two coffee varieties, way of production of coffee, and difference in the root depth of the varieties.

In our studied CS sample, nickel has the highest concentration, while lead, arsenic, and cadmium are detected in much lower concentrations (Table 4). According to Commission Regulation no. 1881/2006 [42], the CS sample could be classified as a dietary supplement, and it could be used for this purpose in the future. The same Regulation states that the maximum permitted level of lead in food additives is 3.0 mg/kg. Since

0.249 ± 0.077 mg/kg of lead is detected in the CS sample, it can be established that the detected amount of lead is not dangerous for the human body and does not pose a danger to human health. Furthermore, the Regulation defines that the maximum permitted amount of cadmium in food supplements may be 1.0 mg/kg. In this paper, it was proved that cadmium in the sample of CS has an amount of 0.106 ± 0.002 mg/kg, which is within the permissible values, and cadmium does not pose a danger to human health. Arsenic is a naturally occurring element in the Earth's crust. It is also present in many foods due to absorption from soil and water. Rice, compared to other foods, can absorb higher amounts of arsenic, and since its consumption is high worldwide, it can contribute to high arsenic exposure. To protect consumers from overexposure, the Codex Alimentarius Commission has recommended that arsenic levels in rice should not exceed 0.2 mg/kg [43]. The main source of arsenic in diet comes from water that has been contaminated with arsenic. Therefore, the World Health Organization (WHO) has set a guideline concentration of 10 µg/L in drinking water [44]. Because of the difficulties with the analysis of (inorganic) arsenic in several food commodities, the maximum allowed levels for arsenic had initially been set for only rice and derived products. Once reliable analytical methods became available, a monitoring campaign for arsenic covering the period 2016–2018 was organised. The aim of this monitoring campaign is to generate reliable occurrence data that can be used to correctly evaluate the need for setting additional maximum levels for other food commodities [45]. Regarding arsenic quantity, Hackethal et al. [46] performed the first German total diet study and found the highest mean levels in the main food group “fish, fish products and seafoods”, followed by “vegetable and vegetable products”, “legumes, nuts, oil seeds and spices”, and “food products for young population”. This study did not include CS in their research. However, the main food group in their study which was very close and comparable to our type of sample, i.e., “coffee, cocoa, tea and infusions”, showed a lower maximum level of total arsenic, while other groups, e.g., “grains and grains-based products”, showed a higher level. Nickel is another metal for which there is currently no maximum residue level (MRL), so it is not possible to know exactly what the maximum allowable level of nickel in food is. In 2015, EFSA summarised the results of various studies to determine the concentrations of nickel in food [47]. According to this report, the highest concentrations of nickel were found in mushrooms, cocoa, cocoa products (>10 mg/kg), beans (9.8 mg/kg), soybeans (5.2 mg/kg), soy products (5.1 mg/kg), nuts (3.6 mg/kg), peanuts (2.8 mg/kg), cereals (2.3 mg/kg), buckwheat (2.0 mg/kg), and oats (1.8 mg/kg). In addition, nickel was found in beer (30 µg/L) and in wine (100 µg/L). EFSA also added that the factors influencing the concentration of nickel in food are growth conditions (much higher concentrations of nickel were found in contaminated soil areas) and the way food is prepared (impact of cooking utensils) [48]. In the CS sample, nickel levels of 2.495 ± 0.055 mg/kg were determined in our research. Since there is no maximum acceptable amount of nickel in food, it cannot be determined whether this amount is too high. However, according to the EFSA report, it can be noticed that nickel is normally present in food in high concentrations. Currently, there are no maximum levels in the EU legislation for nickel as a contaminant in foodstuffs. The maximum limit for nickel in natural mineral water is regulated in the EU by Commission Directive 2003/40/EC [49]. In this Directive, nickel is listed in Annex I among the constituents naturally present in natural mineral water, with a maximum limit of 20 µg/L. Nickel can be released from coffee machines, generally at a low concentration; however, concentrations above the specific release limit (SRL) (up to 780 µg/kg) have been reported after decalcification in two out of eight machines [50]. The authors pointed to the importance of sufficient rinsing after decalcification. Only low releases (maximum: 4.9 µg/L) were detected in the same study when water was boiled in electric kettles. When comparing our results of heavy metals with other studies [7,17] containing mixed CS samples (*C. arabica* and *C. canephora*), we found more lead and cadmium, slightly more arsenic, and almost the same amount of nickel. Additionally, in comparison to another study [51], we found the same amounts of arsenic and cadmium, and very close quantities of lead and nickel. A study by Ballesteros et al. [5]

found lower quantities of nickel and lead while cadmium was slightly higher. The highest amount of nickel (3.17 ± 0.23 mg/kg) was found in a study with a mixed CS sample by Mrtuscelli et al. [52]. All these differences were probably related to the composition of the mixed SC samples (% of both varieties), the way of herb cultivation (ground, water, used fertilisers, and pesticides), and conditions of coffee production (used coffee blends and roasting temperatures).

The determined concentrations of macrominerals (potassium, calcium, sodium, and magnesium) showed that the concentrations of magnesium (4672.5 ± 88.5 mg/kg), calcium ($10,569 \pm 210$ mg/kg), and potassium ($24,311 \pm 764$ mg/kg) partially meet daily needs according to FDA recommendations [53], while sodium concentration (329 ± 79 mg/kg) is significantly lower. Therefore, if CS were used to enrich food products, in the production of new products, or as a food supplement, depending on the amount taken, it would satisfy part of the body's daily need for macrominerals, especially magnesium and calcium, followed by potassium and slightly less sodium. Our macromineral results are in concordance with the data of Costa et al. [16], where the CS sample in their study contains the highest amounts of potassium (5 g/100 g), magnesium (2 g/100 g) and calcium (0.5 g/100 g). Ballesteros et al. [5] reported that their CS sample contains the highest amount of potassium (2.1 g/100 g), followed by calcium (0.9 g/100 g) and magnesium (0.3 g/100 g). Considering the obtained results of micromineral values in our study (iron: 567.50 ± 12.50 mg/kg, copper: 74.90 ± 0.60 mg/kg, manganese: 37.55 ± 0.45 mg/kg, zinc: 16.80 ± 0.70 mg/kg, and chromium: 1.53 ± 0.04 mg/kg) and FDA recommendations [53], it can be concluded that when considering the recommended daily intake of microminerals, CS in certain quantities can successfully meet the daily needs of the human organism for microminerals. Moreover, scientists had examined many minerals in CS, among which were the microminerals examined in this paper. They showed that CS contains 843.3 mg/kg of iron, 63.3 mg/kg of copper, 50.0 mg/kg of manganese, 22.3 mg/kg of zinc, and 1.59 mg/kg of chromium [5]. These results follow the same trend as the results in this work, although slightly higher amounts of microminerals are detected in their sample, except for copper, which is higher in the CS sample analysed in this work. The same authors showed that CS contains a much higher amount of minerals compared to the coffee grounds that remain after coffee preparation, which is an indication that the skin as a by-product of coffee is one of the richer sources of minerals. Additionally, other studies, in comparison to ours, showed a higher content of copper and lower contents of iron, manganese, zinc, and chromium [7,17]. Another study showed similar quantity of chromium while the amounts of iron, zinc, and manganese were higher, and the amounts of magnesium and copper were lower [51]. When comparing our study results regarding valuable mineral quantity to the study by Martuscelli et al. [52], it was evident that except for copper and zinc which had a very similar value, and chromium which had four times smaller quantity in our study, other minerals (potassium, calcium, magnesium, sodium, iron, and manganese) were much higher in our CS study.

Furthermore, dietary fibre (DF) is one of the main dietary factors contributing to customers' well-being. In this study, about 30% of crude fibres (31.97 ± 0.61 g/100 g) were found. Since it is only part of the insoluble fibre, the total fibre content is present in much higher quantity. Narita and Inouye [54] in their work found that CS contains 50–60% dietary fibre, of which 15% is soluble fibre and 85% is insoluble fibre. Insoluble fibres are dominated by cellulose (18%) and hemicellulose (13%) [55]. In addition, it was demonstrated that a high amount of total fibre (54.11 g/100 g) is dominated by insoluble fibres. In comparison to our study, higher amounts of insoluble fibre (46%) in mixed CS samples (*C. arabica* and *C. canephora*) were found [2,5]. Considering the large amounts of fibre, CS has great potential to be used as a raw material in the development of functional food. A recent study summarised the applications of CS-rich ingredients from various sources (e.g., bread, cakes, biscuits, cookies, yoghurt, and burger patties), where many of them replace a certain amount of flour with SC. Thus, this food was characterised as a food with reduced calories and a higher fibre content. Namely, it is very important because

standard Western diet consists of too little fibre but too much calories [8]. Additionally, the same study presented a current overview of the composition of macronutrients and micronutrients, other plant secondary compounds, and contaminants; summarised other possible and valuable applications of CS; and concluded that the toxic effects of CS were not found or expected by evaluating published results of toxicity data [8].

In our study, MW procedure was optimised to obtain the highest concentration of total proteins. Under the conditions of 9 min and power of 200 W during microwave extraction, the highest concentration of extracted total proteins of 0.77 ± 0.07 mg/L in the CS samples was achieved. This concentration of 0.77 mg/L, i.e., 0.007%, in our study is a much lower concentration of proteins in CS. Other studies reported a concentration of proteins ranging from 14 to 19% in CS, which is more than the proportion of proteins in the husk or pulp of coffee beans [5,56]. The statistical processing of the experimental data of MW led to the conclusion that the duration of the extraction, the power of the microwave, and their interrelation are statistically significant factors in protein extraction. In addition to the importance of protein quantity in CS, other studies showed that a small amount of free phenol compounds is present in CS. However, CS has a marked antioxidative activity, which can be attributed to the great amount of melanoidins as Maillard reaction products [55,56]. Furthermore, static batch culture fermentation experiments showed that CS induces the preferential growth of bifidum bacteria rather than clostridia and *Bacteroides* spp. Thus, CS can be proposed as a new potential functional ingredient in consideration of its high content of soluble DF, its marked antioxidant activity, and its potential prebiotic activity [57].

Regarding the classification of CS by the European Union (EU) as a novel food [58] and considering that applications must meet legal requirements regarding composition and toxicity data [59,60], studies on its mutagenic potential are still lacking [58] and many studies nowadays have made scientific efforts to fulfil that goal [2,7,8,17,52,61]. We think that this work could contribute to this regard.

CS can be also used in the cosmetic industry [55] according to the chemical characterisation of coffee residues and their use as potential bioactive ingredients for the development of novel functional products, combined with modern needs in the pharmaceutical and related industries. The cosmetic industry is actively searching for new active ingredients due to the consumer demand for more natural and environmentally friendly products obtained through sustainable resources that can improve the skin's appearance and its health. CS is a very interesting potential candidate to replace synthetic chemicals as an active ingredient in cosmetic formulations due to its high antioxidant potential, phenolic compounds, melanoidins, and caffeine contents. CS is a coffee-roasting by-product that is produced in large amounts every year. Its use can be seen as a gain not only for human health, but also for the environment and industries, which can answer to the principles of sustainability and circular economy. Skin aging is a complex process associated with oxidative metabolism and reactive oxygen species (ROS) generation. CS is a promising matrix that can provide the new fields of cosmetic industry a natural active ingredient that can improve the skin's appearance and health, and counteract skin aging and related diseases, in an environmentally eco-friendly approach. One concern is the presence of ochratoxin (produced by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum*) in CS. However, good practices of coffee harvesting, storage, and transport (especially related to moisture and temperature exposure) and a rigorous quality control could minimise the presence of this mycotoxin [38]. Due to CS's richness in specific bioactive compounds (chlorogenic acids: 1–6%, caffeine: 0.8–1.25%, and melanoidins: 17–23%, among other antioxidants) and confirmed bioactivity in the prevention and/or attenuation of skin aging and related diseases (anti-inflammatory, antimicrobial, anti-cellulite, and anti-hair loss activities, and UV damage protection), CS and its extracts emerge as potential new ingredients for the cosmetic formulation sector [55]. In the modern world, overweight and obesity are the major cause of the metabolic syndrome, which is increasing rapidly in modern societies. As lifestyle changes are insufficient to improve the quality of health, nutraceuticals from the

aspect of functional food from natural sources have attracted much attention as potential therapeutic agents in the prevention and treatment of obesity and other chronic diseases, including cardiovascular diseases and diabetes [62].

5. Conclusions

Based on the obtained results, all investigated target compounds (pesticide residues and heavy metals) are below the maximum permitted levels in food and do not pose a risk to human health. As shown in our results, due to its richness in fibre, its high amount of total proteins extracted by an optimised, eco-friendly method, MW, and its high content of valuable macro- and microminerals, CS could be used in the production of functional foods, food supplements, and cosmetics. We believe that using CS as a novel food even more widely than officially determined can provide joint optimistic approaches to extend investigation further and invest in additional efforts for stronger and more capable production based on this by-product. These approaches would reduce the amount of waste, increase the sustainable development of production, and reduce the amount of mass exploitation of biological resources and the negative impact on the environment.

Author Contributions: Conceptualization, A.R.J. and I.Ž.; writing—original draft preparation, I.Ž., A.R.J., V.B.F., A.B. and A.J.; analysis, A.B., A.J., G.J., A.T. and S.S.; writing—review and editing, I.Ž., A.R.J. and A.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was carried out as part of the project “Food Safety and Quality Center” (Grant No. KK.01.1.1.02.0004). This project is co-financed by the European Union from the European Regional Development Fund.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Perta-Crisan, S.; Ursachi, C.; Munteanu, F.D. Trends in valorisation of spent Coffee grounds: A review. *Scien. Tech. Bull.-Chem. Food Sci. Eng.* **2019**, *16*, 29–40.
2. Gottstein, V.; Bernhardt, M.; Dilger, E.; Keller, J.; Breitling-Utzmann, C.M.; Schwarz, S.; Kuballa, T.; Lachenmeier, D.W.; Bunzel, M. Coffee silver skin: Chemical characterization with special consideration of dietary fiber and heat-induced contaminants. *Foods* **2021**, *10*, 1705. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Bobková, A.; Poláková, K.; Demianová, A.; Belej, L.; Bobko, M.; Jurcaga, L.; Gálik, B.; Novotná, I.; Iriondo-DeHond, A.; Castillo, M.D.d. Comparative analysis of selected chemical parameters of *Coffea arabica*, from cascara to silverskin. *Foods* **2022**, *11*, 1082. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Cantele, C.; Tedesco, M.; Ghirardello, D.; Zeppa, G.; Bertolino, M. Coffee silverskin as a functional ingredient in vegan biscuits: Physicochemical and sensory properties and in vitro bioaccessibility of bioactive compounds. *Foods* **2022**, *11*, 717. [\[CrossRef\]](#)
5. Ballesteros, L.F.; Teixeira, J.A.; Mussatto, S.I. Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food. Bioprocess. Tech.* **2014**, *7*, 3494–3503. [\[CrossRef\]](#)
6. Beltrán-Medina, E.A.; Guatemala-Morales, G.M.; Padilla-Camberos, E.; Corona-González, R.I.; Mondragón-Cortez, P.M.; Arriola-Guevara, E. Evaluation of the use of a coffee industry by-product in a cereal-based extruded food product. *Foods* **2020**, *9*, 1008. [\[CrossRef\]](#)
7. Nolasco, A.; Squillante, J.; Velotto, S.; D’Auria, G.; Ferranti, P.; Mamone, G.; Errico, M.E.; Avolio, R.; Castaldo, R.; Cirillo, T.; et al. Valorization of coffee industry wastes: Comprehensive physicochemical characterization of coffee silverskin and multipurpose recycling applications. *J. Clean. Prod.* **2022**, *370*, 133520. [\[CrossRef\]](#)
8. Lorbeer, L.; Schwarz, S.; Franke, H.; Lachenmeier, D.W. Toxicological Assessment of Roasted Coffee Silver Skin (Testa of *Coffea* sp.) as Novel Food Ingredient. *Molecules* **2022**, *27*, 6839. [\[CrossRef\]](#)
9. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fiber. *EFSA J.* **2010**, *8*, 1462. [\[CrossRef\]](#)
10. Barber, T.M.; Kabisch, S.; Pfeiffer, A.F.H.; Weickert, M.O. The Health Benefits of Dietary Fibre. *Nutrients* **2020**, *12*, 3209. [\[CrossRef\]](#)

11. Cronin, P.; Joyce, S.A.; O'Toole, P.W.; O'Connor, E.M. Dietary Fibre Modulates the Gut Microbiota. *Nutrients* **2021**, *13*, 1655. [CrossRef] [PubMed]
12. Prandi, B.; Ferri, M.; Monari, S.; Zurlini, C.; Cigognini, I.; Verstringe, S.; Schaller, D.; Walter, M.; Navarini, L.; Tassoni, A.; et al. Extraction and chemical characterization of functional phenols and proteins from coffee (*Coffea arabica*) by-products. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1571. [CrossRef] [PubMed]
13. Angeloni, S.; Scortichini, S.; Fiorini, D.; Sagratini, G.; Vittori, S.; Neiens, S.D.; Steinhaus, M.; Zheljazkov, V.D.; Maggi, F.; Caprioli, G. Characterization of odor-active compounds, polyphenols, and fatty acids in coffee silverskin. *Molecules* **2020**, *25*, 2993. [CrossRef]
14. Bertolino, M.; Barbosa-Pereira, L.; Ghirardello, D.; Botta, C.; Rolle, L.; Guglielmetti, A.; Borotto Dalla Vecchia, S.; Zeppa, G. Coffee silverskin as nutraceutical ingredient in yogurt: Its effect on functional properties and its bioaccessibility. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 4267–4275. [CrossRef]
15. Nasti, R.; Galeazzi, A.; Marzorati, S.; Zaccheria, F.; Ravasio, N.; Bozzano, G.L.; Manenti, F.; Verotta, L. Valorisation of coffee roasting by-products: Recovery of silverskin fat by supercritical CO₂ extraction. *Waste Biomass Valorization* **2021**, *12*, 6021–6033. [CrossRef]
16. Costa, A.S.G.; Alves, R.C.; Vinha, A.F.; Costa, E.; Costa, C.S.G.; Nunes, M.A.; Almeida, A.A.; Santos-Silva, A.; Oliveira, M.B.P.P. Nutritional, chemical and antioxidant/pro-oxidant profiles of silverskin, a coffee roasting by-product. *Food. Chem.* **2018**, *267*, 28–35. [CrossRef]
17. Nolasco, A.; Squillante, J.; Esposito, F.; Velotto, S.; Romano, R.; Aponte, M.; Giarra, A.; Toscanesi, M.; Montella, E.; Cirillo, T. Coffee silverskin: Chemical and biological risk assessment and health profile for its potential use in functional foods. *Foods* **2022**, *11*, 2834. [CrossRef] [PubMed]
18. Jaishankar, M.; Tseten, T.; Anbalagan, N.; Mathew, B.B.; Beeregowda, K.N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.* **2014**, *7*, 60–72. [CrossRef]
19. Briffa, J.; Sinagra, E.; Blundell, R. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon* **2020**, *6*, e04691. [CrossRef]
20. Gautam, P.K.; Gautam, R.K.; Chattopadhyaya, M.C.; Banerjee, S.; Chattopadhyaya, M.C.; Pandey, J.D. Heavy metals in the environment: Fate, transport, toxicity and remediation technologies. In *Heavy Metals: Sources, Toxicity and Remediation Techniques*; Pathania, D., Ed.; Nova Science Publishers, Inc.: Hauppauge, NY, USA, 2016; pp. 101–130.
21. Masindi, V.; Muedi, K.L. Environmental contamination by heavy metals. In *Heavy Metals*; Saleh, H.M., Aglan, R.F., Eds.; IntechOpen Limited: London, UK, 2018; pp. 115–133. [CrossRef]
22. Mekonen, S.; Ambelu, A.; Spanoghe, P. Effect of Household Coffee Processing on Pesticide Residues as a Means of Ensuring Consumers' Safety. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 8568–8573. [CrossRef]
23. Pizzutti, I.R.; de Kok, A.; Dickow Cardoso, C.; Reichert, B.; de Kroon, M.; Wind, W.; Weber Righi, L.; Caeli da Silva, R. A multiresidue method for pesticides analysis in green coffee beans using gas chromatography–negative chemical ionization mass spectrometry in selective ion monitoring mode. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1251*, 16–26. [CrossRef] [PubMed]
24. Yang, X.; Wang, J.; Xu, D.C.; Qiu, J.W.; Ma, Y.; Cui, J. Simultaneous Determination of 69 Pesticide Residues in Coffee by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Food. Anal. Methods* **2011**, *4*, 186–195. [CrossRef]
25. Durand, N.; Gueule, D.; Fourny, G. Contaminants in coffee. *Cah. Agric.* **2006**, *2–3*, 192–196. [CrossRef]
26. Kaderides, K.; Papaikononou, L.; Serafim, M.; Goula, A.M. Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. *Chem. Eng. Process.* **2019**, *137*, 1–11. [CrossRef]
27. Vinatoru, M.; Mason, T.J.; Calinescu, I. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *Trends Analyt. Chem.* **2017**, *97*, 159–178. [CrossRef]
28. Ajila, C.M.; Brar, S.K.; Verma, M.; Tyagi, R.D.; Godbout, S.; Valéro, J.R. Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2011**, *31*, 227–249. [CrossRef]
29. Mandal, V.; Mohan, Y.; Hemalatha, S. Microwave Assisted Extraction—An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacogn. Rev.* **2007**, *1*, 7–18.
30. Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Tajnabher, D.; Schenck, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412–431. [CrossRef]
31. Shimadzu's Fundamentals of GC/MS. Available online: <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/gcms/fundamentals/index.html> (accessed on 20 February 2021).
32. Kashani, A.; Mostaghimi, J. Aerosol characterization of concentric pneumatic nebulizer used in inductively coupled plasma—Mass spectrometry (ICP-MS). *At. Sprays* **2010**, *20*, 415–433. [CrossRef]
33. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) Official Method 962.09 Fiber (Crude) in Animal Feed and Pet Food Ceramic Fiber Filter Method. Available online: http://www.aocofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&products_id=1440 (accessed on 20 February 2021).
34. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275. [CrossRef]
35. Azeh Engwa, G.; Udoka Ferdinand, P.; Nweke Nwalo, F.; Unachukwu, N.M. Mechanism and health effects of heavy metal toxicity in humans. In *Poisoning in the Modern World-New Tricks for an Old Dog?* Karcioğlu, O., Arslan, B., Eds.; IntechOpen Limited: London, UK, 2019; pp. 1–23. [CrossRef]

36. Dai, F.J.; Chau, C.F. Classification and regulatory perspectives of dietary fiber. *J. Food. Drug Anal.* **2017**, *25*, 37–42. [CrossRef] [PubMed]
37. European Food Safety Authority (EFSA). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flutriafol. *EFSA J.* **2010**, *8*, 1868. [CrossRef]
38. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Codex Alimentarius Pesticide Index. Available online: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/?tdsourcetag=s_pcqq_aiomsg (accessed on 10 June 2021).
39. European Chemicals Agency (ECHA), Regulation (EU) No 528/2012 Concerning the Making Available on the Market and Use of Biocidal Products, Evaluation of Active Substances, Assessment Report, Piperonyl Butoxide Product-type 18 (Insecticides, Acaricides and Products to Control Other Arthropods), January 2017, Greece. Available online: <https://echa.europa.eu/documents/10162/a521088e-3a21-2bba-96ad-a1fd55e91325> (accessed on 11 June 2021).
40. Harmoko, H.; Kartasasmita, R.E.; Tresnawati, A. QuEChERS Method for the Determination of Pesticide Residues in Indonesian Green Coffee Beans using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Math. Fund. Sci.* **2015**, *47*, 296–308. [CrossRef]
41. Łozowicka, B.; Jankowska, M. Comparison of the effects of water and thermal processing on pesticide removal in selected fruit and vegetables. *J. Elem.* **2016**, *21*, 99–111.
42. The Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2006**, *L364*, 5–24.
43. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Codex Alimentarius Commission-Geneva 14–18 July 2014. Available online: <https://www.fao.org/news/story/en/item/238558/icode/> (accessed on 13 June 2021).
44. World Health Organization (WHO), Arsenic, 7 December 2022. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/arsenic#:~:text=The%20current%20recommended%20limit%20of,removing%20arsenic%20from%20drinking%20water> (accessed on 16 December 2022).
45. European Commission, Arsenic, Arsenic in Food. Available online: https://food.ec.europa.eu/safety/chemical-safety/contaminants/catalogue/arsenic_en (accessed on 21 November 2022).
46. Hackethal, C.; Kopp, J.F.; Sarvan, I.; Schwerdtle, T.; Lindtner, O. Total arsenic and water-soluble arsenic species in foods of the first German total diet study (BfR MEAL Study). *Food Chem.* **2021**, *346*, 128913. [CrossRef]
47. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of nickel in food and drinking water. *EFSA J.* **2015**, *13*, 4002. [CrossRef]
48. European Food Safety Authority (EFSA). The 2015 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J.* **2017**, *15*, 4791. [CrossRef]
49. Commission Directive 2003/40/EC of 16 May 2003 establishing the list, concentration limits, and labelling requirements for the constituents of natural mineral waters and the conditions for using ozone-enriched air for the treatment of natural mineral waters and spring waters. *Open J. Leadersh.* **2003**, *126*, 34–39.
50. Müller, F.D.; Hackethal, C.; Schmidt, R.; Kappenstein, O.; Pfaff, K.; Luch, A. Metal release from coffee machines and electric kettles. *Food Addit. Contam. Part. A Chem. Anal. Control. Expo. Risk. Assess.* **2015**, *32*, 1959–1964. [CrossRef]
51. Zarrinbakhsh, N.; Wang, T.; Rodriguez-Urbe, A.; Misra, M.; Mohanty, A.K. Characterization of wastes and coproducts from the coffee industry for composite material production. *BioResources* **2016**, *11*, 7637–7653. [CrossRef]
52. Martuscelli, M.; Esposito, L.; Di Mattia, C.D.; Ricci, A.; Mastrocola, D. Characterization of Coffee Silver Skin as Potential Food-Safe Ingredient. *Foods* **2021**, *10*, 1367. [CrossRef] [PubMed]
53. Food and Drug Administration (FDA), Daily Value on the New Nutrition and Supplement Facts Labels. 2020. Available online: <https://www.fda.gov/food/new-nutrition-facts-label/daily-value-new-nutrition-and-supplement-facts-labels> (accessed on 21 June 2021).
54. Narita, Y.; Inouye, K. Review on utilization and composition of coffee silverskin. *Food Res. Int.* **2014**, *61*, 16–22. [CrossRef]
55. Bessada, S.M.F.; Alves, R.C.; Oliveira, M.B.P.P. Coffee Silverskin: A review on Potential Cosmetic Applications. *Cosmetics* **2018**, *5*, 5. [CrossRef]
56. Janissen, B.; Huynh, T. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. *Resour. Conserv. Recycl.* **2018**, *128*, 110–117. [CrossRef]
57. Borrelli, R.C.; Esposito, F.; Napolitano, A.; Ritieni, A.; Fogliano, V. Characterization of a New Potential Functional Ingredient: Coffee Silverskin. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1338–1343. [CrossRef]
58. Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2015 on novel foods, amending Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council and repealing Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council and Commission Regulation (EC) No 1852/2001. *Off. J. Eur. Union.* **2015**, *L327*, 1–22.
59. European Union. European Union Commission implementing regulation (EU) 2017/2468 of 20 December 2017 laying down administrative and scientific requirements concerning traditional foods from third countries in accordance with Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council on novel foods. *Off. J. Eur. Union.* **2017**, *L351*, 55–63.

60. European Union. European Union Commission implementing regulation (EU) 2017/2469 of 20 December 2017 laying down administrative and scientific requirements for applications referred to in Article 10 of Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council on novel foods. *Off. J. Eur. Union*. **2017**, L351, 64–71.
61. Klingel, T.; Kremer, J.I.; Gottstein, V.; Rajcic de Rezende, T.; Schwarz, S.; Lachenmeier, D.W. A review of coffee by-products including leaf, flower, cherry, husk, silver skin and spent grounds as novel foods within the European Union. *Foods* **2020**, *9*, 665. [\[CrossRef\]](#)
62. Rippe, J.M. Lifestyle Medicine: The Health Promoting Power of Daily Habits and Practices. *Am. J. Lifestyle Med.* **2018**, *12*, 499–512. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article

Sustainable Ultrasound Assisted Extractions and Valorization of Coffee Silver Skin (CS)

Vedran Biondić Fučkar ¹, Marinela Nutrizio ², Anamarija Grudenić ², Ilija Djekić ³ and Anet Režek Jambrak ^{2,*}

¹ Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia

² Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia

³ Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Nemanjina 6, Zemun, 11080 Belgrade, Serbia

* Correspondence: anet.rezek.jambrak@pbf.unizg.hr

Abstract: The Sustainable Development Goals (SDG) encourage the efficient use of sustainable technologies. Ultrasound-assisted extraction (UAE) is one of the extraction process techniques, which are also directed towards sustainability as a goal. Coffee silver skin (CS), being a healthy raw material as well as a waste, could be utilized in the manufacturing process of new dietary products. The goal of this research was to isolate proteins and polyphenols from CS using UAE and to employ spectrophotometry to determine the yields. Three parts of the research were conducted: ultrasonic extraction, the optimization of UAE conditions for the isolation of proteins and polyphenols from CS, and the analysis of the amino acid extract obtained with the optimal use of UAE. According to the results, it was reported that the highest yields of total polyphenols isolated from the CS using UAE were obtained by applying an amplitude of 75% and a time interval of 9 min. The optimal parameters of UAE, when considering the proportions of total polyphenols and proteins, are an amplitude of 100% and a time of 9 min. The most abundant amino acids in isolated proteins (Asp, Glu, Pro, Gly, and Ala) were defined as well. Based on the use of energy, it was obvious that UAE is a promising technology. This concurs with the proposed practice that when non-thermal technologies are analyzed from an environmental point of view, the first common denominator is the use of electricity to run the equipment, in relation to resource depletion. As expected, CS poses a great waste to be recycled, being a nutritionally rich raw material with great potential. Quantitative consideration on the environmentally friendly applicability of CS in mass production should be carried out to validate the entire process of developing a new product from both economic and environmental aspects.

Keywords: CS; UAE; optimization; proteins; polyphenols



Citation: Biondić Fučkar, V.; Nutrizio, M.; Grudenić, A.; Djekić, I.; Režek Jambrak, A. Sustainable Ultrasound Assisted Extractions and Valorization of Coffee Silver Skin (CS). *Sustainability* **2023**, *15*, 8198. <https://doi.org/10.3390/su15108198>

Academic Editor: Michael S. Carolan

Received: 28 February 2023

Revised: 29 April 2023

Accepted: 11 May 2023

Published: 18 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The investigation of all potential applicable approaches in regard to food processing is an ongoing process with many improvements. There exists a strong connection with customer needs and marketing value. However, the target goals are safe, healthy, sustainable, and minimally processed food. Therefore, it has become obvious that the need for the intensification of food processing came into place, becoming one of the focal points of the food industry. Ultrasound imaging and data analysis is one of the milestones in the food industry, enabling us to perform different methods of analysis and food processing. Some of these examples include cutting, freezing, tempering, drying, homogenizing, degassing, antifoaming, filtering, and extracting [1]. It possesses well-known advantages that are associated with its use during food processing, such as effective mixing, mass transfer increment, energy consumption reduction, and lowering product temperature, as well as the increase of yield of the product. Since the ultrasound can eliminate enzymes and microorganisms while preserving the nutrients, it can serve as a method of choice in the preservation of food, being less destructive in comparison to thermal treatment. This

ultrasound of low output properties can overcome problems that burden the heat treatment of the food, such as changes due to chemical and physical processes, loss in nutritional value, and the modification of organolepticity [2].

It is very important to promote sustainable development such as commitment to social progress, environmental balance, and economic growth. The Sustainable Development Guidelines (SDG) encourage the use of effective techniques in extraction processes. One of these is extraction assisted by high-power ultrasound (Ultrasound-assisted extraction, UAE). Its main advantages are increased extraction yield and a significant reduction in extraction time, energy consumption, and type of solvent. In new extraction techniques, the use of environmentally friendly solvents is involved. The main goal of the industry is to produce efficient products, use energy efficient processes, and make the most of resources and reduce waste. The global goals of sustainable development are listed in Agenda 2030, and their purpose is to shape the strategies and policies of the continuous monetary and social progress, while preserving the environment and natural resources [3].

SDG 12 “Sustainable consumption and production” is one of UN SDG goals targeting food waste with the latest assumption that 13% of food is lost after harvesting and before reaching the retail, combined with an additional 17% of food wasted at the consumer level [4]. Food loss and waste that occur along the food value chain need to be decreased to achieve sustainability goals [5]. Regarding the coffee industry, where by-products are produced in large amounts, coffee silver skin (CS) has become an interesting material for research [6]. Literature reviews on coffee waste, and CS in particular, reveal that it has been analyzed in terms of its phenolic antioxidants and functional compounds [7], regarding the evaluation of coffee waste as mineral sources [8], and in a review article as one of valuable by-products of the coffee industry [9]. However, when it comes to the use of non-thermal technologies, and specifically UAE, the results are limited. Zhang et al. analyzed utilization in producing polyphenol-rich extracts from CS by using ultrasound extractions [10].

Therefore, the aim of this research was to isolate proteins and polyphenols using UAE from CS and to spectrophotometrically determine their proportions. In addition, the perspective was widened to compare the environmental impact of non-thermal techniques with all available research associated with the processing of CS, which displayed a faint correlation when comparing enzyme inhibitory effects and bioactive compounds. This proved that the inhibitory activities could be a result of the activity of non-phenolic molecules, for example terpenoids and alkaloids. Some of these correlations were investigated in previous research [11–17].

2. Materials and Methods

2.1. Samples

Once the roasting of coffee was completed, the samples of by-products (CS samples) were utilized in the research. Samples were acquired from a company that specializes in the production of tea, coffee, and snack products based in Zagreb, Croatia—Franck Ltd. These samples contain a blend of *Coffea robusta* and *Coffea arabica* coffee, since the company collects by-products collected from each of the roasters, which are then transformed into briquettes at that time. Samples of by-products were delivered in the briquette form and were ground into powder to expedite the analysis.

2.2. Chemicals

The following chemicals were used to perform this research: acetone (Lach-Ner, Neratovice, Czech Republic); acetonitrile (Applichem, Darmstadt, Germany); ammonium formate (GramMol, Zagreb, Croatia); argon, 99.9995% (Messer, Bad Soden am Taunus, Germany); certified element reference material (CPAChem, Bogomilovo, Bulgaria); distilled water; nitric acid (Gram-Mol, Zagreb, Croatia); helium, 6.0 (Messer, Bad Soden am Taunus, Germany); methanol (GramMol, Zagreb, Croatia); a mixture of magnesium sulphate, sodium 85 chloride, and citrate salts (Citrato-Kit-01, BEKOlut, Bruchmühlbach-Miesau, Germany); a mixture of magnesium sulphate salt, primary secondary amine, and GCB

(PSA-Kit-06, BEKOlut, Bruchmühlbach-Miesau, Germany); sodium hydroxide (T.T.T., Sveta Nedelja, Croatia); petrol ether (Applichem, Chicago, IL, USA); sulfuric acid (Chemistry, Zagreb, Croatia); and hydrogen peroxide (Gram-Mol, Zagreb, Croatia).

2.3. Methods for Determination of Target Compounds in CS Sample

The experimental part of this research was divided into three parts. In the first part, extraction from the CS was performed under certain conditions, and the mass fraction of protein and polyphenols from the extract was determined spectrophotometrically. During the second part of the research, UAE conditions for the isolation of proteins and polyphenols from CS were optimized. Finally, in the third part, an analysis of the amino acid extract obtained under optimal UAE conditions was performed.

2.3.1. Ultrasonic Extraction

Proteins and polyphenolic compounds were isolated by applying UAE to CS samples. UAE extraction was performed with an Ultrasonic processor Q700 (manufacturer Qsonica, SAD), using deionized water as the extraction solvent.

In the first part of the research, ultrasound-assisted extraction was performed using different variations of the extraction parameters, such as time (3, 6, and 9 min) and amplitude (50, 75, and 100%). Temperature was not allowed to exceed 40 °C (to prevent protein denaturation), thus obtaining 9 extracts as shown in Table 1. Each extraction was performed in duplicate. The experimental design was made in STATGRAPHICS Centurion software (StatPoint technologies, Inc., Warrenton, VA 20186, USA) [5]. This research in fact consisted of 18 experiments since the extraction was performed in duplicate (9×2). The goal of designing an experiment is to determine the statistical impact of each factor. Therefore, this was organized in factorial design. The independent variables were amplitude (A) and treatment time (B). The output values were the proportion of total proteins and the proportion of total polyphenols. The goal of this analysis was to monitor the change of parameters (temperature, power, energy, dT, total change) every 15 seconds.

Table 1. Experimental design optimization of UAE conditions.

Sample No.	Amplitude (%)	Time (min)
U1	50	3
U2	75	3
U3	100	3
U4	50	6
U5	75	6
U6	100	6
U7	50	9
U8	75	9
U9	100	9

In the second part of the study, the optimization of UAE conditions was performed using the STATGRAPHICS software to define the optimal extraction conditions at which the highest yields of polyphenolic compounds and proteins were achieved. The analysis of the results using the Response Surface Methodology (RSM) was performed with 95% confidence. Additionally, the analysis of variance (ANOVA) found a statistically significant difference ($p \leq 0.05$) between dependent and independent variables and the relationship between independent and dependent variables. Since the RSM method usually does not determine the form of connection of dependent and independent variables, a lower-order polynomial was used in the corresponding range of independent variables, in the form of a linear function of independent variables. From the results obtained, the analysis obtained optimal UAE parameters.

2.3.2. Spectrophotometric Determination of Total Polyphenols

Principle of Determination

The determination of total polyphenolic compounds was carried out in an aqueous extract using the spectrophotometric method. The method is based on the colorimetric reaction of the Folin-Ciocalteu reagent (FCR) with a reducing reagent [18]. The intensity of staining was directly proportional to the proportion of polyphenolic compounds in the tested sample. These were performed with all samples U1–U9.

Sample Preparation

The provided extract should be diluted 2 times with water prior to the procedure for the determination of total polyphenols.

Determination Procedure

In a glass tube, 0.1 mL of extract, 7.9 mL of distilled water, and 0.5 mL of FCR (previously diluted 1:2 into water) were pipetted, and 1.5 mL 20% sodium carbonate solution (Na_2CO_3) was added. The contents of the tube were stirred well again on the Vortex device. The prepared samples were allowed to stand for 2 h at room temperature (Figure 1); after that, the blue color absorbance was measured at 765 nm, in correlation with the negative control. The negative control was set up in the same way as the testing samples, but instead of the sample, 0.1 mL of distilled water was added to the mixture.



Figure 1. CS samples with visible blue color.

2.4. Environmental Impact

The environmental impact of using UAE was performed by analyzing its impacts associated with the functional unit of one UAE treatment. The chosen environmental footprint used in this research was the Global Warming Potential (GWP), as it outlines the weighted impacts of greenhouse gases for the time span of 100 years (IPPC, 2013) [19]. It is expressed as g CO_2 equivalent (CO_{2e}). Calculations based on the identified inventory of the use of electric energy were performed using data from the open life cycle assessment (LCA) and corresponding life cycle inventory (LCI) database (PEF launched by the European Commission in 2013) [20].

2.4.1. Determination of Protein Concentration by the Lowry Method

Principle of Determination

The determination of protein concentration according to the Lowry method was carried out in the water extract of the sample using spectrophotometry [21]. The reaction was based on the formation of a complex of copper ions with peptide bonds; in alkaline conditions, the copper ion Cu^{2+} formed a complex with peptide bonds, reducing to Cu^+ . While the FCR reagent was reduced, the amino acid residues of tyrosine, tryptophan, and cysteine reacted with the reagent, forming an unstable product, which was then reduced to molybdenum/tungsten. At the same time, a complex of blue-violet coloring was formed with an absorbance maximum of 740 nm. These were performed with all samples, U1–U9.

Sample Preparation

A total of 10 mL of the sample (extract) was piped into a Falcon test tube. Then, 40 mL of acetone was added to precipitate the proteins. The Falcon tube with the sample was stored in the freezer for 15 min at -18°C . Then, the samples were tempered and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was separated from the precipitate by decantation. The precipitate was washed out with 10 mL of acetone and finally dissolved in 10 mL of distilled water. Before determining the protein concentration, the samples were diluted 5 times with distilled water.

Determination Procedure

Firstly, 0.4 mL of the protein sample and 2 mL of reagent C (mixture of reagent A, i.e., 2% sodium carbonate in 0.1 M sodium hydroxide, and reagent B, i.e., 0.5% copper sulphate pentahydrate in 1% potassium sodium tartrate, all in the ratio 1:50) were piped into a glass test tube, mixed, and incubated at room temperature for 10 to 15 min.

Then, 0.2 mL of FCR was all at once added and well again stirred using the Vortex device. The reaction mixture was incubated at room temperature for 40 to 60 min. Absorbance was measured at a wavelength of 740 nm with a spectrophotometer (Lambda 25, UV/VIS spectrophotometer). The negative control was prepared in the same way, but instead of the sample, the extraction solvent (distilled water) was added.

2.4.2. Amino Acid Analysis

The quantitative analysis of amino acids was performed using the Waters AccQ•Tag method according to the manufacturer's instructions (Waters), and it included hydrolysis, the derivatization of amino acids with the AccQ•Fluor derivatization reagent, and high-performance liquid chromatography (HPLC) quantitative analysis.

The size-exclusion high-performance liquid chromatography (SEC-HPLC) method used protein separation based on size with the following parameters:

Column: 3 μm , 4.6×300 mm, BioSec-3, Agilent Volumen inject. sample: 10 μL ;
Injection volume. Standard: 5 μL , Detection: 215;
Flow: 0.3 mL/min;
Mobile phase A: 145 mM NaH_2PO_4 , pH = 7.0;
Column temperature: 20°C ;
Flushing: Isocratic.

Hydrolysis

A total of 5 μL of each sample was evaporated to dryness in a vacuum concentrator. The precipitate was dissolved in 200 μL of 6 M HCl with the addition of 4% phenol. Hydrolysis was carried out for 24 h under a vacuum at 114°C . The resulting hydrolysate was evaporated to dryness in a vacuum concentrator at 60°C .

Derivatization

After drying, the sample was dissolved in 20 μL of 20 mM HCl. Derivatization was performed using AccQ•Fluor Reagent according to the manufacturer's instructions (Waters

AccQ•Tag Chemistry Package Instruction Manual). After derivatization, the samples were filtered through a 0.2 µm pore size filter. A standard solution of amino acids with a concentration of 2.5 mM was diluted to a concentration of 100 pmol/µL. Derivatization was performed using AccQ•Fluor Rea.

Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE

After protein extraction and precipitation, protein separation was performed using Invitrogen™ Novex™ Tris-Glycine, 4–12%, 1.5 mm gel according to the manufacturer's instructions. Next to that, the proteins were visualized with Coomassie brilliant blue G250 dye. After protein digestion in the gel, peptide analysis was performed using a mass spectrometer.

After recording the MS and MS/MS spectra, the obtained data were used for a database search using the ProteinScape program, version 3.0 (Bruker, Mannheim, Germany). An in-house database containing proteins from *Coffea canephora* was created. The protein sequences used were downloaded from the UniProt database (26,073 entries).

2.4.3. Statistical Analysis

The STATGRAPHICS 19 software system (Statgraphics Technologies, Inc., Plains, VA, USA) was used for the experimental design of the experiment and statistical data processing [21]. In the experimental part of the research related to the optimization of extraction parameters for the isolation of bioactive compounds from CS samples, the independent variables were, as mentioned, treatment time interval (3, 6, and 9 min) and amplitude (50, 75, and 100%). On the other side, dependent variables were the proportion of total polyphenols (mg 100 g⁻¹) and the proportion of total proteins (mg L⁻¹). To compare samples, variance analysis (ANOVA) was used to identify discrepancies in the treatments performed.

The parameters had a statistically significant effect if $p < 0.05$. The results processed in Statgraphics are presented using response surface methodology (RSM). RSM encompasses a set of statistical and mathematical methods used to develop, improve, and optimize processes. The precision of the quadratic empirical model was verified by analysis of variance (ANOVA) with a 95% confidence level.

3. Results

In the first part of this research, the UAE extraction of polyphenols and proteins from CS was performed. Deionized water was used as the extraction solvent because it is a cheap, ecologically, and technologically acceptable solvent and, at the same time, one of the most common solvents of "Green Chemistry". The mass fraction of total polyphenols and proteins in the sample was determined by spectrophotometric analysis. The obtained results were processed and presented in the form of tables as the mean value of two parallel measurements with the associated standard error. Additionally, the data recorded during the execution of UAE for each sample were processed.

The optimization of UAE conditions was performed as the second part of this research. The extraction parameters were varied, e.g., amplitude (50, 75, and 100%) and treatment time (3, 6, and 9 min), where the temperature of the extraction mixture should not exceed 40 °C. To optimize the results, they were statistically processed using STATGRAPHICS and are shown graphically and tabularly.

In the last part of this research, the analysis of protein and amino acid samples obtained by optimal UAE parameters was performed. The results are presented in the form of chromatograms and tables.

3.1. Results of Physical Parameters during UAE Processing

The data presented in Table 2 are the mean values of the monitored values of temperature, power, and energy every 15 seconds during the treatment. The goal of this analysis was to monitor the change of the mentioned parameters every 15 seconds. The increasing

trend of power, energy, and temperature during the performance of UAE was monitored. Furthermore, the total change in energy was calculated with respect to the time interval (15 s), the change in the temperature of the sample within that interval, the specific heat capacity of CS (calculated based on its composition), and the mass of the sample. From the results, it was concluded that the most intensive treatment (U3) achieved the highest energy value ($19,447.380 \pm 0.526$ J), while the lowest energy value was recorded with sample U9 (4890.222 ± 0.533 J). Both results are logical considering the extraction conditions and their correlation.

Table 2. Average values of parameters monitored during UAE processing.

Sample No.	Time (min)	Amplitude (%)	Temperature (°C)	Power (W)	Energy (J)	dT	Total Change (J s ⁻¹) *
U1	3	50	20.64 ± 0.10	50.72 ± 0.03	4890.22 ± 0.53	0.31 ± 1.69	2.12 ± 0.34
U2	3	75	22.38 ± 0.12	69.58 ± 0.02	6585.21 ± 0.55	1.000 ± 1.32	5.10 ± 0.41
U3	3	100	25.88 ± 0.10	85.17 ± 0.03	8203.71 ± 0.52	1.21 ± 0.76	4.27 ± 0.27
U4	6	50	21.64 ± 0.16	49.75 ± 0.04	9401.94 ± 0.55	0.82 ± 2.10	4.48 ± 0.56
U5	6	75	18.54 ± 0.17	61.85 ± 0.11	12,235.23 ± 0.53	0.92 ± 1.59	4.08 ± 0.57
U6	6	100	18.04 ± 0.24	68.24 ± 0.28	14,256.51 ± 0.52	1.00 ± 0.83	4.37 ± 0.27
U7	9	50	17.11 ± 0.14	48.04 ± 0.08	13,727.17 ± 0.56	0.82 ± 1.93	3.23 ± 0.81
U8	9	75	19.82 ± 0.36	60.74 ± 0.18	18,151.55 ± 0.53	1.82 ± 1.34	9.04 ± 0.29
U9	9	100	20.19 ± 0.32	63.68 ± 0.32	19,447.38 ± 0.50	1.19 ± 1.29	5.50 ± 0.34

* The mass of the sample is 110 g, and the specific heat capacity of the sample is $15,114 \text{ J K}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

However, this is not the rule for all parameters; thus, the highest power was recorded for sample U8 (85.167 ± 0.032 W) and the lowest for sample U4 (48.042 ± 0.075 W). A possible source of error is the existence of agglomerates in some samples. If such an agglomerate came close to the ultrasonic probe, it crushed it, but at the same time, it used more power than with a homogeneous sample and then an incorrect value was recorded.

3.2. Influence of UAE on the Proportion of Total Polyphenols

Table 3 shows the results of measuring the mass fraction of total polyphenols after UAE. The mass fraction of total polyphenols in the CS sample ranged from 375.5722 ± 0.05 mg GAE 100 g^{-1} to 525.6778 ± 0.03 mg GAE 100 g^{-1} . Sample U8, which was treated for 9 min and with an amplitude of 75%, showed the highest mass fraction of total polyphenols (525.6778 ± 0.03 mg GAE 100 g^{-1}). A slightly lower value of the share of total polyphenols was shown by sample U6 treated for 6 min with an amplitude of 100% (483.9389 ± 0.03 mg GAE 100 g^{-1}); sample U9 showed a lower value than expected. Considering that it was treated with the highest amplitude and for the longest time, it was assumed that it would show the highest value of the share of total polyphenols.

Table 3. Results of measuring the mass fraction of total polyphenols in the CS sample.

Sample No.	Time (min)	Amplitude (%)	Total Polyphenols (mg GAE */100 g)
U1	3	50	375.57 ± 0.05
U2	3	75	397.72 ± 0.06
U3	3	100	434.33 ± 0.05
U4	6	50	386.97 ± 0.03
U5	6	75	436.48 ± 0.03
U6	6	100	483.95 ± 0.03
U7	9	50	413.23 ± 0.09
U8	9	75	525.68 ± 0.03
U9	9	100	456.86 ± 0.03

* GAE—Gallic acid equivalent.

However, this did not happen; the sample was only third in the series (456.8556 ± 0.03 mg GAE 100 g^{-1}). As expected, the lowest value was measured in sample U1, which was subjected to a treatment of 3 min and an amplitude of 50% (375.5722 ± 0.05 mg GAE 100 g^{-1}). The lower value of the mass fractions of polyphenols of the samples was the result of poor solvent selection.

When performing the extraction, it is necessary to pay strong attention to all factors that can affect the success of the extraction, such as UAE device design, treatment temperature, treatment time interval, type of solvent, ultrasonic intensity, frequency, and amplitude. According to the mentioned recent research, colorimetric methods are not considered a precise method for determining the exact chemical composition of a sample. Namely, the problem arises from the fact that the FCR reacts not only with phenols, but also with some other compounds; thus, the results obtained in this way are not fully representative of the percentage of phenols in the extracts.

Statistical Processing of Results and Optimization of Parameters

The analysis of variance (ANOVA) table splits the variability of the proportion of total polyphenols for each of the factors. The results of the variance analysis for the share of total polyphenols (Table 4) showed that the change in the height of the amplitude and the time interval had no significant effect on the share of total polyphenols ($p > 0.05$). Additionally, the inter-relationships of independent variables on the proportion of polyphenols were analyzed, and no statistically significant influence was observed ($p > 0.05$). Therefore, when designing the extraction model, attention should be paid to the influence of the mentioned parameters.

Table 4. The analysis of variance for the proportion of total polyphenols.

Source	Sum Square	Degrees of Freedom	Mean Value Square	F-Ratio	p-Value
A: amplitude	6623.8	1	6623.8	4.30	0.13
B: time	5899.76	1	5899.76	3.83	0.15
AA	1584.21	1	1584.21	1.03	0.39
AB	57.2141	1	57.21	0.04	0.86
BB	7.21873	1	7.22	0.00	0.95
Total error	4626.57	3	1542.19	-	-
Total (correlation)	18,798.8	8	-	-	-

R-quadrant = 75.389%. R-quadrant (adjusted for degrees of freedom) = 34.3706%. Standard error, estimate = 39.2707. Mean absolute error = 19.8987. Durbin-Watson statistic = 2.17122 ($p = 0.7028$). Lag 1 residual autocorrelation = -0.190183.

Figures 2 and 3 show response surface diagrams for the proportion of total polyphenols, from which it is clear that time and amplitude did not have a statistically significant effect on the proportion of polyphenols, but it is noted that time still affected the extraction yield. With a longer extraction time, the proportion of extracted polyphenols increased. With the help of these diagrams, certain factors can be corrected in future research, given that, in the mentioned diagrams, the response to the smallest change in experimental factors is the fastest.

3.3. Influence of UAE on the Proportion of Total Proteins

From the results shown in Table 5, it is visible that the highest mass fraction of protein was measured in the U3 sample (1.10 ± 0.08 mg L^{-1}), which was treated with ultrasound for 3 min with an amplitude of 100%. Then, the samples U9 and U6 followed, where a similar value of protein content was measured, 0.87 ± 0.09 mg L^{-1} and 0.87 ± 0.06 mg L^{-1} . All three samples had the same amplitude (100%), which proved to be the most effective in protein extraction, while the same thesis was not valid for polyphenols. The negative trend continued.

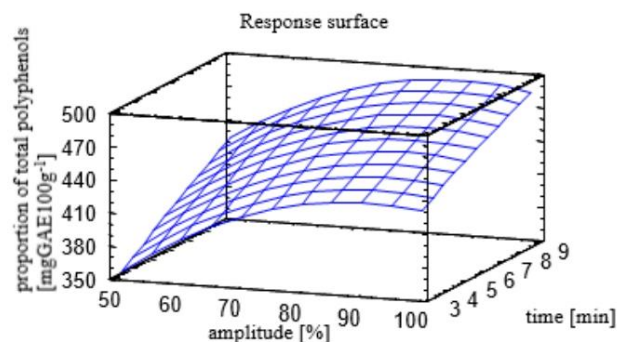


Figure 2. Three-dimensional response surface diagram for the proportion of total polyphenols.

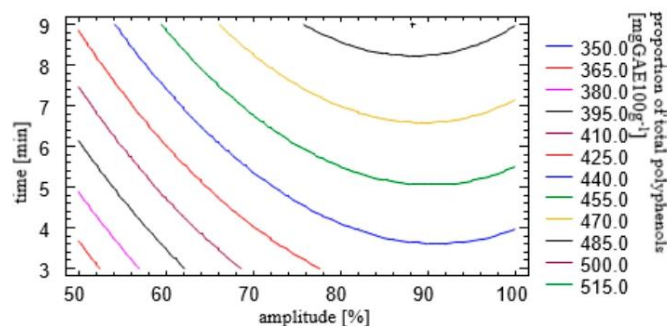


Figure 3. Contour diagram of the response surface for the proportion of total polyphenols.

Table 5. Results of measuring the mass fraction of total proteins in the CS sample.

Sample No.	Time (min)	Amplitude (%)	Total Proteins (mg/L Sample)
U1	3	50	0.66 ± 0.10
U2	3	75	0.61 ± 0.10
U3	3	100	1.10 ± 0.08
U4	6	50	0.51 ± 0.12
U5	6	75	0.74 ± 0.14
U6	6	100	0.87 ± 0.06
U7	9	50	0.71 ± 0.12
U8	9	75	0.62 ± 0.05
U9	9	100	0.87 ± 0.09

The lowest value of the protein mass fraction was measured in the sample U4 ($0.51 \pm 0.12 \text{ mg L}^{-1}$), which was treated for 6 min with an amplitude of 50%. When performing the experiment, it was assumed that sample U9 would contain the highest proportion of protein and sample U1 the lowest proportion of protein. Since the highest value of time (9 min) and amplitude (100%) was applied during the treatment of sample U9 and the lowest value of time (3 minutes) and amplitude (50%) was applied to sample U1, the results of the research showed otherwise. A possible reason is the human factor during the experiment and the creation of extremely high temperature micro areas caused by cavitation.

Zhang et al. found a protein content of 10.16% in a CS sample after UAE [10]. In his research, Wen measured a slightly higher proportion of protein (14.62%) compared to the already mentioned research by Zhang et al. [22].

Statistical Processing of Results and Optimization of Parameters

From the results obtained by the analysis of variance for the proportion of total proteins (Table 6), where the statistical significance of each factor was tested by comparing the mean square with the experimental error estimate, amplitude had a significant statistical effect on the proportion of total proteins ($p < 0.05$). The p -value was 0.0365, indicating that it was significantly different from zero at the 95.0% confidence level. From this, it can be concluded that the height of the amplitude had the greatest effect on protein yield during UAE. Therefore, when optimizing UAE parameters, the height of the amplitude should be carefully adjusted to achieve optimal extraction results.

Table 6. Statistically significant variables for the proportion of total proteins.

Source	Sum Square	Degrees of Freedom	Mean Value Square	F-Ratio	p -Value
A: amplitude	0.154465	1	0.154465	13.02	0.0365
B: time	0.00509834	1	0.00509834	0.43	0.5589
AA	0.0342783	1	0.0342783	2.89	0.1877
AB	0.0187964	1	0.0187964	1.58	0.2972
BB	0.0061642	1	0.0061642	0.52	0.5231
Total error	0.0355909	3	0.0118636	-	-
Total (correlation)	0.254393	8	-	-	-

R-squared = 86.0095%. R-squared (adjusted for degrees of freedom) = 62.692%. Standard error of estimate = 0.10892. Mean absolute error = 0.0521975. Durbin-Watson statistic = 1.65259 ($p = 0.1959$). Lag 1 residual autocorrelation = 0.107298. Value marked in italic indicate statistically significant values ($p \leq 0.05$).

The graphic representation of the 3D diagram (Figure 4) and the contour diagram (Figure 5) represents a hypothetical model that changes the proportion of total proteins by changing the value of the amplitude and treatment time. The model was created after it was noted that the amplitude value during extraction had the most significant effect.

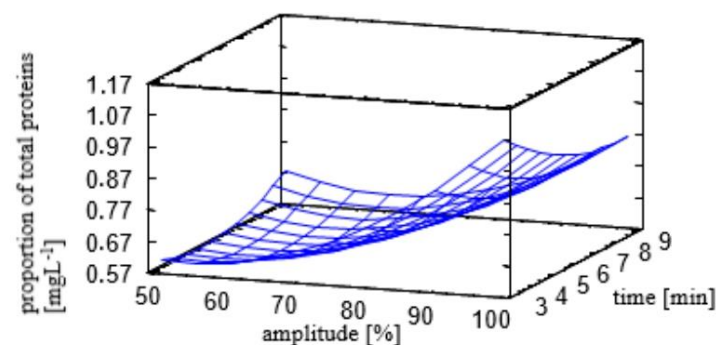


Figure 4. Three-dimensional response surface plot for the proportion of total proteins.

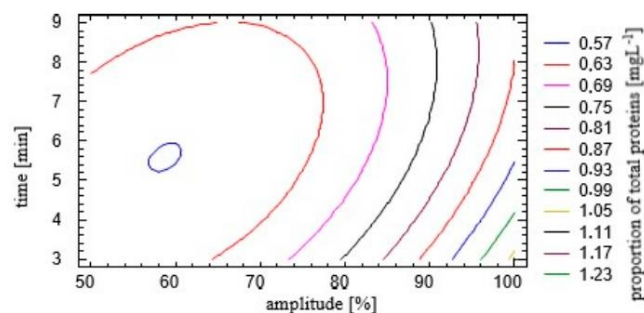


Figure 5. Contour plot of the response surface for the proportion of total proteins.

The semicircular lines of the contour diagram show the path of the steepest ascent or descent. The graphical representation represents the path from the center of the current experimental region along which the estimated response changed the fastest for the smallest change in the experimental factors. With its help, it can be easier to manipulate the process if it is needed to increase or decrease the amount of protein.

3.4. Results of Amino Acid Analysis

Isolated protein samples subjected to protein and amino acid analysis were selected based on the optimal results of the proportion of total proteins. Statistical analysis revealed the influence of amplitude on the proportion of protein, while time had no significant effect. Therefore, the U3 sample (100% and 3 min) showed the highest protein concentration, and sample U2 (75% and 3 min) (Table 7). It is important to take into consideration the influence of the amplitude change on the protein composition, independent of the protein concentration and the time interval.

Table 7. Calculated concentrations of amino acids in the CS samples.

Amino Acids	RT	U2 (pmol μL^{-1})	U3 (pmol μL^{-1})
Asx *	12.45	539.03	577.53
Ser	14.05	148.91	163.49
Glx *	14.75	423.38	454.45
Gly	16.15	382.67	412.37
His	16.69	34.22	38.87
Arg	20.42	110.81	121.82
Thr	21.17	92.49	100.72
Ala	22.47	206.32	226.69
Pro	24.63	486.73	523.03
Tyr	28.06	41.72	46.99
Val	29.09	110.71	125.81
Met	29.54	12.08	14.12
Lys	31.61	44.60	48.98
Ile	32.50	82.36	94.52
Leu	33.03	85.17	98.27
Phe	34.11	52.33	60.83

* During acid hydrolysis, Asp was converted to Asn, and Glu to Gln therefore cannot be individually quantified. Therefore, Asp and Asn were determined together and denoted as Asx, and Glu and Gln as Glx. Note: Tryptophan and cysteine were degraded during hydrolysis; therefore, these amino acids were not determined by this method.

After the amino acid analysis of samples U2 and U3, the concentrations of individual amino acids were read from the obtained HPLC chromatograms (Figures 6 and 7) and are shown in Table 7. It is noted that the highest concentration of amino acids is Asx in both samples. Asx represents the cumulative concentration of amino acids Asn and Asp. Namely, during the implementation of acid hydrolysis, the conversion of Asp to Asn

occurred, which is why it was not possible to define the exact proportion of an individual amino acid. Furthermore, the samples contained a significant concentration of the amino acid Pro. It was $486.73 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ in sample U2, while it was $523.03 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ in sample U8. Amino acid Glx was slightly less concentrated in both samples. Additionally, a cumulative concentration was noted due to conversion during hydrolysis, Glu to Gln. The amino acids Asp and Glu are known as umami amino acids, due to the specific effect on taste during the consumption of foods rich in these amino acids. The amino acid Gly, which is also the simplest amino acid in terms of structure, follows in the order of representation. The analysis revealed the presence of almost all essential amino acids (Phe, His, Ile, Leu, lys, Met, Tyr, Val). Thr is missing, which cannot be measured by this method because its degradation occurs. This presents the great potential of CS application in human nutrition. The concentrations of amino acids in both samples differed minimally, but the concentrations of all amino acids were slightly higher in sample U3 (Table 7). The reason for this is that sample U3 contained a higher mass fraction of total proteins ($1.10 \pm 0.08 \text{ mg L}^{-1}$) compared to sample U2 ($0.61 \pm 0.10 \text{ mg L}^{-1}$).

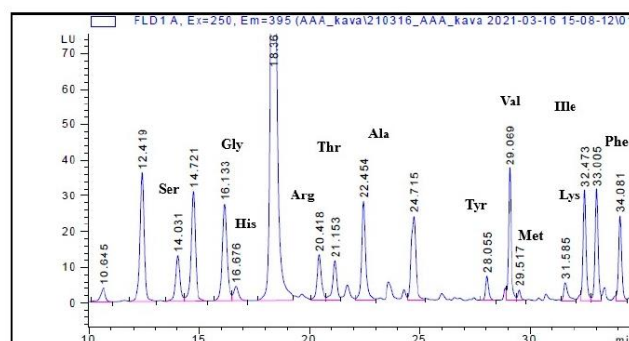


Figure 6. HPLC chromatogram of sample U2.

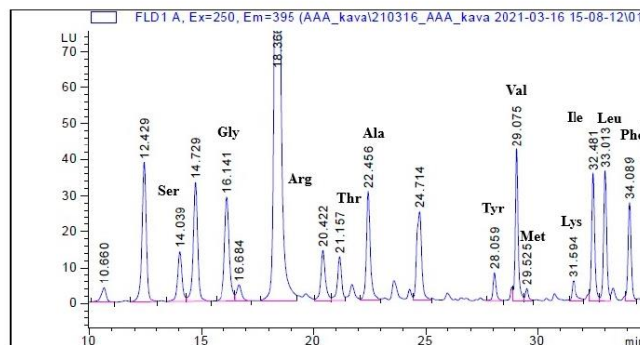


Figure 7. HPLC chromatogram of sample U3.

3.5. Results of SEC-HPLC Analysis

The results of the HPLC-SEC analysis are shown in Figure 8. However, due to the low resolution, the SEC HPLC method was not used as a separation technique that preceded identification with a mass spectrometer. Therefore, the SDS-PAGE protein analysis was performed.

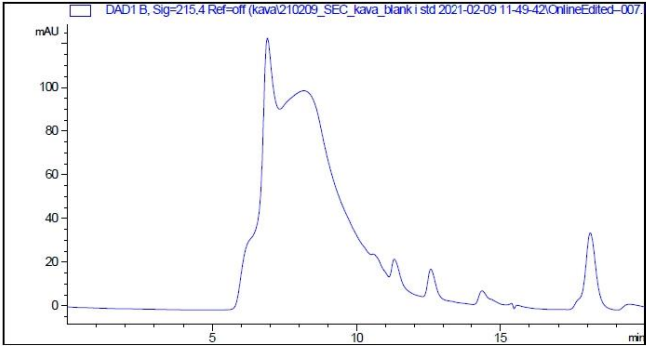


Figure 8. SEC-HPLC chromatogram of sample U2 and U3.

All protein lines marked on the gel were used for MS identification (Figure 9). The analysis was performed on samples U2 and U3. On SDS-PAGE, the molecular weight (Mw) of proteins were visible. After protein extraction and separation, peptide analysis was performed with a mass spectrometer. The obtained results were identified using the UniProt database (Table 8).

3.6. Environmental Impact

Derived from the design of the experiment, a mass-energy balance model of a lab-scale UAE was developed, as proposed by Režek Jambrak et al. [23]. The main environmental impact was associated with the consumption of electric energy depending on the power and time needed for the treatment. Table 9 presents the results of calculated global warming potential (GWP).

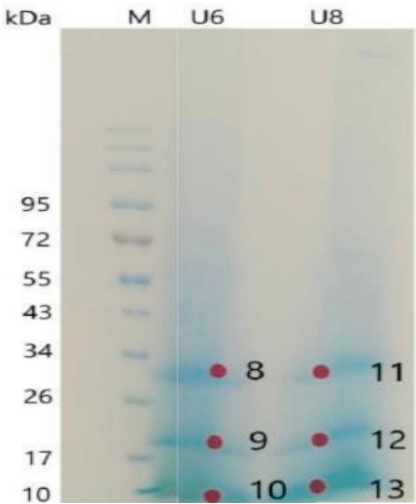


Figure 9. Gel obtained after SDS-PAGE.

Table 8. List of identified proteins in the samples.

Line on the Gel	Access Number *	MW (kDa)	Evaluation of the Hit **	Number of Identified Peptides	Protein
1	A0A068TV85	48.9	416.1	7	Uncharacteristic
2	A0A068V707	70.2	827.4	12	Uncharacteristic
4	A0A068VGK6	15.7	244.5	6	Contains Barwin domains
5	A0A068V707	70.2	599.5	9	Uncharacteristic
7	A0A068VGK6	15.7	144.2	4	Contains Barwin domains
8	A0A068V707	70.2	322.6	6	Uncharacteristic
10	A0A068VGK6	15.7	144.2	4	Contains Barwin domains
11	A0A068V707	70.2	851.3	15	Uncharacteristic
13	A0A068VGK6	15.7	144.2	4	Contains Barwin domains

* Accession number in the UniProt database. ** Values above 35 are considered statistically significant ($p < 0.05$).

Table 9. List of calculated global warming potential (GWP).

Sample No.	Amplitude (%)	Time (min)	GWP (g CO _{2e})
U1	50	3	1.31
U2	75	3	1.80
U3	100	3	2.21
U4	50	6	2.58
U5	75	6	3.21
U6	100	6	3.54
U7	50	9	3.74
U8	75	9	4.72
U9	100	9	4.95

Functional unit—one treatment. In this table, the results of GWP are shown in accordance with amplitude and time. All nine samples were included for the calculation.

4. Discussion

The presented results show that the amino acid concentrations in both samples differed only slightly, but the concentrations of all amino acids were somewhat higher in sample U3 (Table 7). The reason for this is that sample U3 contained a higher mass fraction of total proteins ($1.10 \pm 0.08 \text{ mg L}^{-1}$) compared to sample U2 ($0.61 \pm 0.10 \text{ mg L}^{-1}$), as presented in Table 5.

Similar results were obtained by Zhang et al. in their research [10]. They compared the proportions of phenolic compounds and amino acids in CS samples, beer wort, and potato peel after UAE. In their research, deionized water was used as an extraction solvent. The authors carried out acid hydrolysis using a 6 M solution of hydrochloric acid. They found that the most abundant amino acids were Asx and Glx ($9 \pm 0.2 \text{ mg g}^{-1}$). However, the amino acid Pro was not detected. Amino acids Gly ($6 \pm 0.1 \text{ mg g}^{-1}$) and Ala ($5 \pm 0.2 \text{ mg g}^{-1}$) followed in order of abundance. No essential amino acids were detected. They measured the total amount of amino acids, being equal to $85 \pm 4 \text{ mg g}^{-1}$. Potato peel samples showed significantly lower values of amino acids, which can be read from the total amount of amino acids ($42 \pm 3 \text{ mg g}^{-1}$). On the other hand, the beer wort samples contained a significantly higher proportion of amino acids ($237 \pm 16 \text{ mg g}^{-1}$) compared to the other samples. Consequently, the authors concluded that beer wort has the greatest potential as a raw material for the isolation of certain amino acids. Nzekoue et al., in their research, showed that water is the worst solvent for the extraction of polyphenols [24].

In his research, Wen studied the influence of UAE on the proportion of amino acids in CS sample [22]. It is important to emphasize that he carried out sequential alkaline-acidic extraction and applied an ultrasound intensity of 38 W cm^{-2} and a time interval of 10 min. Finally, he carried out the alkaline hydrolysis of proteins. Consequently, he acquired somewhat different results. The concentration of total amino acids was $230.98 \pm 17.50 \text{ nmol mL}^{-1}$ (0.2 M NaOH) and $435.61 \pm 1.80 \text{ nmol mL}^{-1}$ (0.6 M NaOH).

The most abundant amino acid in both cases was Gly, followed by Asp and Glu. However, he did not detect most of the essential amino acids; only a few were identified.

Due to the low resolution of the SEC-HPLC method, the SDS-PAGE protein analysis was performed. The analysis was performed on samples U2 and U3. Looking at the image after SDS-electrophoresis, it was visible that both samples contained proteins of similar value. It was concluded that changing the extraction parameter does not significantly affect the protein size. The protein paths are clearly visible in the picture (Figure 9). The electrophoretic mobility of proteins depends on their charge density; the higher the charge density ratio, the higher the mobility.

When the protein solution is subjected to the action of an electric field, the molecules move depending on the density of their charge. They move at different speeds towards the anode or cathode and thus separate. Each protein has its characteristic isoelectric point.

The largest identified protein mass was 70.2 kDa, while the lowest mass was 15.7 kDa. A protein with a mass of 15.7 kDa was characterized as a protein containing a Barwin domain. It was assumed that its structure contained about 125 amino acids and three disulfide bridges due to the content of the amino acid Cys. The second protein that was found had no specific characteristics, except for its large mass. During his research, Wen (2019) analyzed the mass of isolated proteins and recorded somewhat different results. However, he used different extraction methods. The protein mass range was between 4.99 and 6.89 kDa. He performed SEC-HPLC analysis for certain proteins and detected a significantly large peak related to high molecular weight (M_w) proteins (between 375 kDa and 520 kDa) and smaller peptides ranging from 1.8 to 8.8 kDa. Therefore, he concluded that the application of sequential acid and alkaline extraction can affect the hydrolysis of proteins into smaller proteins or shorter peptides.

According to the obtained results, a conclusion can be made that the highest yields of total polyphenols (525.68 ± 0.03 mg GAE 100 g^{-1}) isolated from CS using UAE were obtained by applying an amplitude of 75% and a time interval of 9 min, while the highest total protein yield (1.10 ± 0.08 mg L^{-1}) was achieved using an amplitude of 100% and a treatment time of 3 min. The statistical analysis of the parameters revealed that the amplitude has a statistically significant influence on the protein mass concentration ($p < 0.05$). However, none of the parameters had a statistically significant influence on the mass fraction of polyphenols.

Regarding the results obtained by the analysis of variance for the proportion of total proteins, where the statistical significance of each factor was tested by making a comparison of the mean square with the experimental error estimate, the amplitude had a significant statistical effect on the proportion of total proteins ($p < 0.05$). The p -value was 0.0365, indicating that it was significantly different from zero at the 95.0% confidence level. From this point of view, a conclusion can be made that the height of the amplitude had the greatest effect on protein yield during UAE. Therefore, when optimizing UAE parameters, the height of the amplitude should be carefully adjusted to achieve optimal extraction results.

The results of the UAE optimization showed that the optimal values of the proportion of protein (0.8685 mg L^{-1}) and polyphenols (485.317 mg GAE 100 g^{-1}) were achieved by applying an amplitude of 100.00% and a time of 9 min. However, in individual analyses, the height of the amplitude had a significant influence on the proportion of proteins. The influence of time on the proportion of polyphenols was visible, but it was not statistically significant. Consequently, this should be considered when designing the UAE to reduce the unnecessary consumption of energy and other resources.

The optimal UAE parameters for the proportion of total polyphenols were an amplitude of 88.09% and a treatment time of 9 min. Additionally, the optimal UAE parameters for the proportion of total proteins were an amplitude of 100% and a treatment time of 3 min. The optimal parameters of UAE, when considering the proportions of total polyphenols and proteins, were an amplitude of 100% and a time of 9 min.

Moreover, life cycle assessment (LCA) methodology is widely employed to evaluate the product system's life cycle impact on the environment [14]. Taking into consideration that CS represents a nutritionally rich raw material with great potential, especially regarding the production of functional food, the results encourage sustainable development in the food industry. Finally, with the quantitative consideration of sustainability (life-cycle assessment, LCA analysis) in mind, some assumptions are necessary. One of the main considerations that affect the model outcome is whether CS is considered a potential useful material in reprocessing. Generally, CS is a residue and, when performing an LCA, can therefore be seen as either a co-product or as a waste. If CS is considered a waste, then system boundary is supposed to be set to begin with the waste itself. Additionally, a production system cut-off should be applied. Conversely, if CS is looked upon as a co-product, then the system boundary should be set in order to include every necessary process required to achieve that co-product, such as coffee cultivation, transport, handling, and roasting.

According to all mentioned, based on the use of energy, it was obvious that UAE is a promising technology. This concurs with the proposed practice that, when non-thermal technologies are analyzed from an environmental point of view, the first common denominator is the use of electric energy for running the equipment, related to resource depletion [25]. It is common that the cleaning and sanitation of the equipment may also be considered, but in our case, as this activity occurred in between all treatments, their impact could bias the results; thus, they were excluded.

The sustainability of these technologies is still under the scrutiny of research. It is obvious that, besides short food treatments and their energy friendly perspective, these technologies also use deionized water which is an environmentally friendly extraction solvent. However, technology readiness levels (and their application at industrial level) are still obscure. As discussed by Mulder et al., all new technologies are perceived as an "open design challenge" since different sustainability aspects must be considered, such as how are the initial costs (as the economic dimension of sustainability) for setting up the technology at an industrial level estimated [26].

5. Conclusions

Based on the obtained results and the performed statistical analysis, it can be concluded that UAE was successfully carried out, during which changes in energy, power, and temperature values were monitored. Proteins and polyphenols were isolated from a CS sample.

According to obtained results, a conclusion can also be made that the highest yields of total polyphenols isolated from the CS using UAE were obtained by applying an amplitude of 75% and a time interval of 9 min. The optimal parameters of UAE, when considering the proportions of total polyphenols and proteins, were an amplitude 100% and time 9 min.

The most abundant amino acids in isolated proteins are Asp, Glu, Pro, Gly, and Ala. Isolated proteins contain almost all essential amino acids. The analysis of the isolated proteins revealed an average protein mass of 15.7 kDa and 70.2 kDa. The protein with an average mass of 15.7 kDa contained a Barwin domain.

CS represents a nutritionally rich raw material with great potential, especially in the production of functional food, encouraging sustainable development in the food industry. As expected, CS represents a nutritionally rich raw material with a bright future. A quantitative consideration of sustainability (life cycle assessment, LCA analysis) on the applicability of CS in mass production should be performed to validate the whole process of developing new products, regarding both economic and environmental aspects.

Another potential use of these results could be as the sustainable reuse of waste material (CS) and the UAE of proteins. These aspects can present an answer for the industry to obtain valuable proteins.

Author Contributions: Conceptualization, A.R.J. and I.D.; writing—original draft preparation, V.B.F.; analysis, A.G. and M.N.; writing—review and editing, A.R.J. and I.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Myo, H.; Khat-udomkiri, N. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from coffee pulp using propylene glycol as a solvent and their antioxidant activities. *Ultrason. Sonochem.* **2022**, *89*, 106127. [CrossRef] [PubMed]
2. Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A.G.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Abert-Vian, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. *Ultrason. Sonochem.* **2017**, *34*, 540–560. [CrossRef] [PubMed]
3. UN. Transforming Our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development. Available online: <https://sdgs.un.org/2030agenda> (accessed on 11 November 2022).
4. UN. Ensure Sustainable Consumption and Production Patterns. Available online: <https://sdgs.un.org/goals/goal12> (accessed on 13 November 2022).
5. Djekic, I.; Battle-Bayer, L.; Bala, A.; Fullana-i-Palmer, P.; Jambrak, A.R. Role of the Food Supply Chain Stakeholders in Achieving UN SDGs. *Sustainability* **2021**, *13*, 9095. [CrossRef]
6. Martuscelli, M.; Esposito, L.; Di Mattia, C.D.; Ricci, A.; Mastrocola, D. Characterization of Coffee Silver Skin as Potential Food-Safe Ingredient. *Foods* **2021**, *10*, 1367. [CrossRef] [PubMed]
7. Murthy, P.S.; Naidu, M.M. Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. *Food Bioprocess Technol.* **2012**, *5*, 897–903. [CrossRef]
8. Ninčević Grassino, A.; Šušić, I.; Fiket, Ž. Evaluation of coffee and coffee waste fractions as mineral sources based on their multi-element composition. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2022**, 1–20. [CrossRef]
9. Arya, S.S.; Venkatram, R.; More, P.R.; Vijayan, P. The wastes of coffee bean processing for utilization in food: A review. *J. Food Sci. Technol.* **2022**, *59*, 429–444. [CrossRef] [PubMed]
10. Zhang, Z.; Poojary, M.M.; Choudhary, A.; Rai, D.K.; Lund, M.N.; Tiwari, B.K. Ultrasound processing of coffee silver skin, brewer's spent grain and potato peel wastes for phenolic compounds and amino acids: A comparative study. *J. Food Sci. Technol.* **2021**, *58*, 2273–2282. [CrossRef] [PubMed]
11. Zengin, G.; Sinan, K.I.; Mahomoodally, M.F.; Angeloni, S.; Mustafa, A.M.; Vittori, S.; Maggi, F.; Caprioli, G. Chemical composition, antioxidant and enzyme inhibitory properties of different extracts obtained from spent coffee ground and coffee silverskin. *Foods* **2020**, *9*, 713. [CrossRef] [PubMed]
12. Angeloni, S.; Nzekoue, F.K.; Navarini, L.; Sagratini, G.; Torregiani, E.; Vittori, S.; Caprioli, G. An analytical method for the simultaneous quantification of 30 bioactive compounds in Spent Coffee Ground by HPLC-MS/MS. *J. Mass Spectrom.* **2020**, *55*, e4519. [CrossRef] [PubMed]
13. Iriondo-DeHond, A.; Martorell, P.; Genovés, S.; Ramón, D.; Stamatakis, K.; Fresno, M.; Molina, A.; Del Castillo, M.D. Coffee silverskin extract protects against accelerated aging caused by oxidative agents. *Molecules* **2016**, *21*, 721. [CrossRef] [PubMed]
14. Nzekoue, F.K.; Angeloni, S.; Navarini, L.; Angeloni, C.; Freschi, M.; Hrelia, S.; Vitali, L.A.; Sagratini, G.; Vittori, S.; Caprioli, G. Coffee silverskin extracts: Quantification of 30 bioactive compounds by a new HPLC-MS/MS method and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Food Res. Int.* **2020**, *133*, 109128. [CrossRef] [PubMed]
15. Ramón-Gonçalves, M.; Gómez-Mejía, E.; Rosales-Conrado, N.; León-González, M.E.; Madrid, Y. Extraction, identification and quantification of polyphenols from spent coffee grounds by chromatographic methods and chemometric analyses. *Waste Manag.* **2019**, *96*, 15–24. [CrossRef] [PubMed]
16. Janissen, B.; Huynh, T. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. *Resour. Conserv. Recycl.* **2018**, *128*, 110–117. [CrossRef]
17. Kamgang Nzekoue, F.; Khamitova, G.; Angeloni, S.; Sempere, A.N.; Tao, J.; Maggi, F.; Xiao, J.; Sagratini, G.; Vittori, S.; Caprioli, G. Spent coffee grounds: A potential commercial source of phytosterols. *Food Chem.* **2020**, *325*, 126836. [CrossRef] [PubMed]
18. Shortle, E.; O'Grady, M.N.; Gilroy, D.; Furey, A.; Quinn, N.; Kerry, J.P. Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **2014**, *98*, 828–834. [CrossRef] [PubMed]
19. IPCC. AR5 Reports, Climate Change, Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2014. Available online: <https://www.ipcc.ch/assessment-report/ar5/> (accessed on 21 November 2022).

20. European Platform on Life Cycle Assessment. Available online: <https://eplca.jrc.ec.europa.eu/EnvironmentalFootprint.html> (accessed on 21 November 2022).
21. Laxminandan, S.; Deeptimayi, D.; Pritijyotsna, S.; Taslima, N.A.; Siba, P.P. Quantitation of total protein content in some common edible food sources by lowry protein assay. *Lett. Appl. NanoBioSci.* **2020**, *9*, 1275–1283. [[CrossRef](#)]
22. Wen, L.; Zhang, Z.; Rai, D.; Sun, D.-W.; Tiwari, B.K. Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from coffee silverskin: Impact on phenolic content, antioxidant activity, and morphological characteristics. *J. Food Process Eng.* **2019**, *42*, e13191. [[CrossRef](#)]
23. Jambrak Režek, A.; Vukušić, T.; Donsi, F.; Paniwnyk, L.; Djekic, I. Three Pillars of Novel Nonthermal Food Technologies: Food Safety, Quality, and Environment. *J. Food Qual.* **2018**, *2018*, 8619707. [[CrossRef](#)]
24. Statgraphics 19 Centurion. Available online: <https://www.statgraphics.com/> (accessed on 21 November 2022).
25. Djekic, I.; Tomasević, I. Analysis and Comparison of Environmental Impacts of Nonthermal Food Technologies. In *Nonthermal Processing in Agri-Food-Bio Sciences*; Režek Jambrak, A., Ed.; Food Engineering Series; Springer: Cham, Switzerland, 2022. [[CrossRef](#)]
26. Mulder, K.; Ferrer, D.; Lente, H.V. *What Is Sustainable Technology? Perceptions, Paradoxes and Possibilities*; Sustainability Responsibility Accountability; Routledge: London, UK, 2011; Volume 44, pp. 1–7.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

10. ŽIVOTOPIS

Vedran Biondić Fučkar je rođen 22.03.1983. u Varaždinu, RH.

Nakon završene osnovne i srednje škole upisao je Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu na kojem je 2007. diplomirao s temom „Biorazgradiva ambalaža“. Nakon toga je upisao poslijediplomski specijalistički studij *Razvoj lijekova* na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, kojeg je završio 2014. obranom završnog rada pod naslovom „Homeopatski lijekovi“. Potom upisuje doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti na istome Fakultetu.

Autor je tri znanstvena rada te nekoliko stručnih radova, a uz to je sudjelovao na različitim domaćim i stranim kongresima, radionicama i znanstvenim skupovima s posterskim izlaganjima iz područja održivog razvoja, analitičkih metoda te sustava kvalitete u farmaciji i medicini.

Zaposlen je u privatnoj kompaniji u području medicinske tehnologije. Aktivno svira orgulje, klavir i harmoniku te pjeva u nekoliko zborova.

Popis objavljenih radova:

Izvorni znanstveni radovi u Current Contents (CC) časopisima:

Biondić Fučkar V, Božić A, Jukić A, Krivohlavek A, Jurak G, Tot A, et al. Coffee Silver Skin - Health safety, nutritional value and microwave extraction of proteins. *Foods* 2023;12,518. doi: <https://doi.org/10.3390/foods12030518>

Biondić Fučkar V, Nutrizio M, Grudenić A, Djekić I, Režek Jambrak A. Sustainable ultrasound assisted extractions and valorization of Coffee Silver Skin (CS). *Sustainability* 2023;15,8198. doi: <https://doi.org/10.3390/su15108198>

Nutrizio M, Dukić J, Sabljak I, Samardžija A, **Biondić Fučkar V**, Djekić I, et al. Upcycling of Food By-Products and Waste: Nonthermal Green Extractions and Life Cycle Assessment Approach. *Sustainability* 2024; 16,9143. doi: <https://doi.org/10.3390/su16219143>

Ostali znanstveni i stručni radovi:

Biondić Fučkar V, Nutrizio M, Grudenić A, Djekić I, Režek Jambrak A. Impact of non-thermal techniques in the processing of coffee silverskin (CS). 7th Faculty of Science PhD Student Symposium 2023, PMF Zagreb, Hrvatska, 2023. (poster, neobjavljeni rad, stručni)

Biondić Fučkar V, Grudenić A, Božić A, Djekić I, Režek Jambrak A. Health safety and nutritional value of coffee silverskin with impact of emerging techniques in the processing. 10th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Zagreb, Hrvatska, 2022. (poster, neobjavljeni rad, stručni)