



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, 2024.



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, 2024

Ovaj doktorski rad je izrađen u Zavodu za opće programe, Laboratoriju za održivi razvoj Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta i na Zavodu za biokemiju prehrane 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.

U izradi ovog rada moji su se prijatelji i kolege svojom stručnom pomoći i podrškom te kao ispitanici uključivali bez imalo ustručavanja i pomogli mi u anketnom djelu svojim odgovorima o praksi odlaganja otpada kave u svakodnevnoj rutini i uopće poznavanju problematike održivog razvoja.

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 mogućnosti primjene UAE i MAE u ekstrakciji proteina i peptida iz SPK, okarakterizirati dobivene ekstrakte s obzirom na prinose ciljnih komponenti i udjela drugih bioaktivnih sastavnica (polifenola) te odrediti ukupni ekološki otisak optimiranih ekstrakcijskih procesa. S obzirom na ostatke pesticida i teških metala SPK se može smatrati zdravstveno ispravnom te je ona u tom smislu iskoristiva kao sekundarna sirovina. Optimizacijom UAE/MAE pokazano je da sva tri čimbenika: amplituda ultrazvuka/snaga mikrovalova (A), vrijeme ekstrakcije (B) i njihov međusobni odnos (AB), imaju značajan utjecaj na promjenu udjela ukupnih proteina. Najveći prinos proteina ( $1,1012 \pm 0,08$  mg L<sup>-1</sup>) dobiven je primjenom UAE (3 min/100%). U slučaju MAE prinosi proteina bili su značajno niži - najveći postignuti prinos bio je  $0,7734 \pm 0,07$  mg/L (9 min/200 W). Ekstrakti su sadržavali su sve esencijalne aminokiseline što ukazuje na prihvatljivu kvalitetu proteina i potencijal za upotrebu u ljudskoj prehrani. Raspon veličina 3 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 dobivanja bioaktivnih peptida. Dobiveni ekstrakti sadržavali su značajne količine polifenolnih spojeva, neovisno o primijenjenim uvjetima ekstrakcije. Značajno veća potrošnja energije MAE u usporedbi s UAE doprinijela je znatno višem GWP-u. (4,95 g CO<sub>2</sub>e/UAE naspram 15,5 g CO<sub>2</sub>e/MAE) GWP optimalne UAE za ekstrakciju proteina iz SPK iznosio je 509,5 g CO<sub>2</sub>e/kg otpada (u slučaju odlaganja), a dodatno se reducira na 231,0 g CO<sub>2</sub>e/kg otpada (u slučaju kompostiranja preostalog otpadnog materijala). Dobiveni rezultati predstavljaju značajan doprinos trenutnim i ograničenim saznanjima o mogućnostima korištenja SPK kao izvora proteina i biološki vrijednih peptida te pružaju originalan uvid u potencijal globalnog zagrijavanja procesa ponovnog iskorištavanja SPK, 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 silver skin (CSS) is a by-product of the classic coffee processing process 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). 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 (polyphenols) in obtained extracts (2); and the overall ecological footprint of the optimized UAE/MAE processes used for obtaining the extracts (3). The major goal of conducting UAE/MAE was to reduce extraction time while simultaneously reducing the use of extraction solvents.

**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 sanitary safety of CSS was conducted, to investigate its applicability as a secondary raw material. In the second part of investigation UAE and MAE extraction processes for obtaining proteins from CSS were optimized and compared (optimization was carried out by focusing on protein yield as the output parameter). Extracts obtained under optimized conditions were characterized in terms of polyphenol content (1); amino acid composition (2); and content and characterization of target peptides (3). In the third part of investigation the environmental footprints of the developed processes for obtaining protein extracts from CCS using UAE/MAE 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. 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. In the framework of sanitary safety investigations CSS

was assessed for pesticide- and heavy metal residues. For pesticide determination extraction was conducted by Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe method (QuEChERS). 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). Microwave extraction (MAE) of CSS samples was performed using a closed microwave extraction system and ultrasonic extraction (UAE) of CSS samples was performed with the probe using deionized water as extraction agent. The design of the experiment was made in the STATGRAPHICS Centurion software. The input parameters were time (3, 6 and 9 min) and amplitude (50, 75 and 100 %)/microwave strength (100, 150 or 200W) with the condition that the temperature should not exceed 40 °C (to prevent protein denaturation), which resulted in obtaining 9 extracts. The output parameters was the yield of total proteins, while the content of polyphenols was also monitored. Each extraction was performed in duplicate. Protein concentration was determined spectrophotometrically by the Lowry method which is based on the reaction of  $\text{Cu}^{2+}$  with peptide bonds of proteins in an alkaline medium, resulting in  $\text{Cu}^{2+}$  being reduced to  $\text{Cu}^+$ . Quantitative analysis of amino acids was performed using the Waters AccQ•Tag method according to the manufacturer's instructions (Waters, Milford, USA) and includes hydrolysis, derivatization of amino acids with AccQ•Fluor derivatization reagent and HPLC quantitative analysis. As part of protein characterization, gel filtration chromatography (i.e. size exclusion chromatography) and SEC-HPLC analysis were performed; a mixture of proteins of known molecular weight used to determine the molecular weight of the samples. Electrophoresis in a polyacrylamide gel (sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) was also performed. Total phenolic content was determined spectrophotometrically by the colorimetric reaction of the Folin-Ciocalteu reagent. In the Folin–Ciocalteu 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 Folin–Ciocalteu is reduced to tungsten and molybdenum oxides, which are colored blue. Global Warming Potential (GWP) in the process of 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. In addition to energy consumption, the main parameters include CO<sub>2</sub> (carbon dioxide) emissions, energy consumption, transport, amount of waste and determination of composting potential. Data were obtained from the CCaLC2 database.

**Results.** CSS samples can be considered sanitary safe and applicable for the use as secondary raw materials with respect to pesticide and heavy metal residues (based on the comparison of the levels of pesticides and heavy metals with maximal permissible concentrations set for food and dietary supplements). Of the 265 pesticides analysed, only three pesticides were detected in the used samples: flutriafol ( $0,012 \pm 0,002$  mg/kg), imidacloprid ( $0,016 \pm 0,002$  mg/kg) and piperonyl butoxide ( $0,002 \pm 0,000$  mg/kg). Of the heavy metals analysed, nickel ( $2,495 \pm 0,055$  mg/kg) has the highest concentration in the samples used, while lead ( $0,249 \pm 0,077$  mg/kg), arsenic ( $0,107 \pm 0,018$  mg/kg) and cadmium ( $0,106 \pm 0,002$  mg/kg) are present in significantly lower concentrations. Concentrations of flutriafol, imidacloprid and piperonyl butoxide residues, as well as nickel, lead, arsenic and lead that were determined in the analysed samples were lower than maximal permissible levels so can be considered sanitary safe and acceptable for use as raw material. In the second part of investigations UAE and MAE-assisted procedures for extraction of proteins from CSS were developed and compared. The conditions tested 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 three factors: ultrasound amplitude/microwave power (A), extraction time (B) and their mutual relationship (AB), have a significant effect on the change in the proportion of total proteins. The highest protein yields ( $1,1012 \pm 0,08$  mg/L) were 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 ( $0,7734 \pm 0,07$  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 ( $525,6778 \pm 0,03$  mg EGK  $100^{-1}$  g<sup>-1</sup>) was obtained after 9-minute extraction at 75 % amplitude, and in MAE after 6-minute extraction at 150 W ( $677,8111 \pm 0,03$  mg EGK/100 g). However, under the mild range of tested conditions (optimized for protein extraction)



none of the tested factors (microwave power and extraction time) showed statistical significance ( $p > 0.05$ ). 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 potential for use in human nutrition (except no data was obtained for Trp and Cys due to degradation that occurs during protein hydrolysis). The most abundant amino acids were Asx (joint concentration of aspartic acid and asparagine) (539,66 and 533,02  $\mu\text{mol/L}$ ); Pro (485,60 and 488,52  $\mu\text{mol/L}$ ) and Glx, (the joint concentration of glutamic acid and glutamine) (403,9 and 440,91  $\mu\text{mol/L}$ ) independently of the type of extraction procedure. In the view of protein characterization, the goal was to determine the proteins that contain Barwins domain, as they can be considered as valuable 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 global warming potential (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 and energy consumption and consequently GWP. Our analysis showed significantly higher energy consumption of MAE compared to UAE resulting in significantly higher GWP. The sample M2 with a GWP of 15,5 g CO<sub>2</sub>e showed the highest GWP. On the other side the highest UAE GWP (sample U3) was 4,95 g CO<sub>2</sub>. GWPs obtained for 9 UAE extraction conditions ranged from 131 - 495 g CO<sub>2</sub>e/ 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 CO<sub>2e</sub>/kg waste. In the case of composting the remaining waste, the total GWP is reduced 231,0 g CO<sub>2e</sub>/kg of waste CSS.

**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 Bowman'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. This shows clearly that there are significant differences between different "green" processing techniques and that the "green aspect" of any approach should be objectively and thoroughly analysed. This case is a clear example of why GWP (or other ecological footprint markers) should be considered as significant outgoing parameter (together with the yields of targeted compound) during development and optimization of particular processing methodology.

**Keywords:** Coffee silver skin (CSS); Ultrasound-assisted extraction (UAE); microwave-assisted extraction (MAE); optimization; proteins; polyphenols; Global Warming Potential (GWP)

## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>2</b>
1.1 INDUSTRIJA KAVE KROZ POVIJEST.....	3
1.2 SREBRNA POKOŽICA KAVE (SPK) KAO SEKUNDARNA SIROVINA .....	6
1.3 SPK KAO IZVOR PROTEINA .....	9
1.4 SPK KAO IZVOR POLIFENOLA .....	11
1.5 BIOLOŠKI UČINCI PESTICIDA.....	12
1.6 BIOLOŠKI UČINCI TEŠKIH METALA .....	15
1.7 MIKROVALNA EKSTRAKCIJA (ENGL. MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION, MAE).....	18
1.7.1 Mehanizam djelovanja mikrovalova.....	18
1.7.2 Primjena mikrovalova u industriji .....	19
1.8 ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA (ENGL. ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION, UAE).....	22
1.8.1 Mehanizam djelovanja ultrazvuka .....	22
1.8.2 Primjena ultrazvuka u industriji.....	24
1.9 ŽIVOTNI CIKLUS PROIZVODA (ENGL. LIFE CYCLE ANALYSIS, LCA).....	26
1.9.1 Faze analiza životnog ciklusa proizvoda .....	27
1.9.2 Indeks održivosti procesa (engl. Sustainable Process Index, SPI).....	28
1.10 KRUŽNO GOSPODARSTVO .....	29
1.10.1 ISO standardi niza ISO 59000.....	29
1.10.2 Agenda 2030.....	32
1.10.3 Ukupni ekološki otisak proizvoda.....	33
1.10.4. Europski zeleni plan.....	34
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>	<b>40</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>43</b>
3.1 MATERIJALI .....	44
3.1.1 Uzorci .....	44
3.1.2 Kemikalije i standardi.....	44
3.1.3 Reagensi.....	45
3.1.4 Instrumenti i uređaji.....	46
3.1.5 Programski paketi .....	47
3.2 PLAN ISTRAŽIVANJA I METODOLOGIJA .....	47
3.2.1 Određivanje zdravstvene ispravnosti SPK .....	51
3.2.1.1 Određivanje ostataka pesticida .....	51
3.2.1.2 Određivanje teških metala .....	53
3.2.2 Optimizacija ekstrakcije proteina i polifenola iz SPK postupkom mikrovalne ekstrakcije.....	56
3.2.3 Optimizacija ekstrakcije proteina i polifenola iz SPK postupkom ultrazvučne ekstrakcije .....	57
3.2.4 Određivanje sadržaja i karakterizacija proteina .....	60
3.2.4.1 Određivanje ukupnih proteina metodom po Lowryju .....	60
3.2.4.2 Određivanje aminokiselinskog sastava uzoraka .....	62
3.2.4.3 Karakterizacija proteina.....	64
3.2.4.4 Određivanje ukupnih polifenola.....	66
3.2.6 Određivanje potencijala globalnog zatopljenja (GWP) kod procesa dobivanja ekstrakata SPK.....	67
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>69</b>
4.1 ZDRAVSTVENA ISPRAVNOST SPK.....	70
4.1.1 Udio ostataka pesticida u SPK.....	70
4.1.2 Udio teških metala u SPK .....	71
4.2 PRIMJENJIVOST MIKROVALNE EKSTRAKCIJE U REVALORIZACIJI SPK .....	73
4.2.1 Udio i kvaliteta proteina u MAE ekstraktima SPK .....	73
4.2.1.1 Udio ukupnih proteina u MAE ekstraktima SPK .....	73
4.2.1.2 Aminokiselinski sastav MAE ekstrakta SPK .....	77
4.2.1.3 Karakterizacija proteina/peptida u MAE ekstraktima SPK.....	78
4.2.2. Udio polifenola u MAE ekstraktima SPK.....	80

4.3	<i>Primjenjivost ultrazvučne ekstrakcije u revalorizaciji SPK.....</i>	83
4.3.1	<i>Udio i kvaliteta proteina u UAE ekstraktima SPK.....</i>	83
4.3.1.2	<i>Aminokiselinski sastav UAE ekstrakata SPK.....</i>	86
4.3.1.3	<i>Karakterizacija proteina u UAE ekstraktima SPK .....</i>	87
4.3.2	<i>Udio i kvaliteta polifenola u ekstraktima SPK .....</i>	89
4.4	ANALIZA ŽIVOTNIH CIKLUSA .....	91
4.4.1	<i>GWP ekstrakcije proteina iz SPK.....</i>	91
4.4.2	<i>GWP proteinskih ekstrakta SPK dobivenih procesom UAE kroz LCA.....</i>	94
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>98</b>
5.1	ZDRAVSTVENA ISPRAVNOST SPK.....	99
5.2	VALORIZACIJA SPK KAO SEKUNDARNE SIROVINE ZA DOBIVANJE PROTEINA – USPOREDBA MAE I UAE .....	100
5.3	VALORIZACIJA SPK KAO SEKUNDARNE SIROVINE ZA DOBIVANJE POLIFENOLA – USPOREDBA MAE I UAE .....	105
5.4	UGLIČNI OTISAK DOBIVANJA PROTEINSKOG EKSTRAKTA SPK – VAŽNOST PROCESA EKSTRAKCIJE I UPRAVLJANJA OTPADOM..	108
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI .....</b>	<b>114</b>
<b>7.</b>	<b>POPIS LITERATURE .....</b>	<b>117</b>
<b>8.</b>	<b>POPIS KRATICA.....</b>	<b>132</b>
<b>9.</b>	<b>PRILOZI .....</b>	<b>134</b>
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>139</b>

# **1. UVOD**

## 1.1 Industrija kave kroz povijest

Među najrazvijenijim i ekonomski najprofitabilnijim industrijama u 21. stoljeću je svakako prehrambena industrija i to industrija kave. S obzirom na učestalost konzumacije i moderniziranjem pripreme različitih okusa i varijanti ovog napitka, kava je svakako vrlo interesantan materijal za detaljnija istraživanja.

Industrija kave ima dugu i raznoliku povijest koja se proteže kroz sve dijelove svijeta. Kava potječe iz Etiopije, gdje su prvi put zabilježene divlje biljke kave. Prema legendi je kava otkrivena 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.

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 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 kava 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 kave, 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) kako bi se regulirali međunarodni trgovinski odnosi i cijene kave.

U suvremenom dobu, postoji veći naglasak na raznolikosti kave i održivim praksama u uzgoju i proizvodnji. Pojavljuju se certifikati poput Fair Tradea i organske certifikacije kako bi se osiguralo da kava bude proizvedena na održiv način i da se pravedno plaćaju proizvođači.

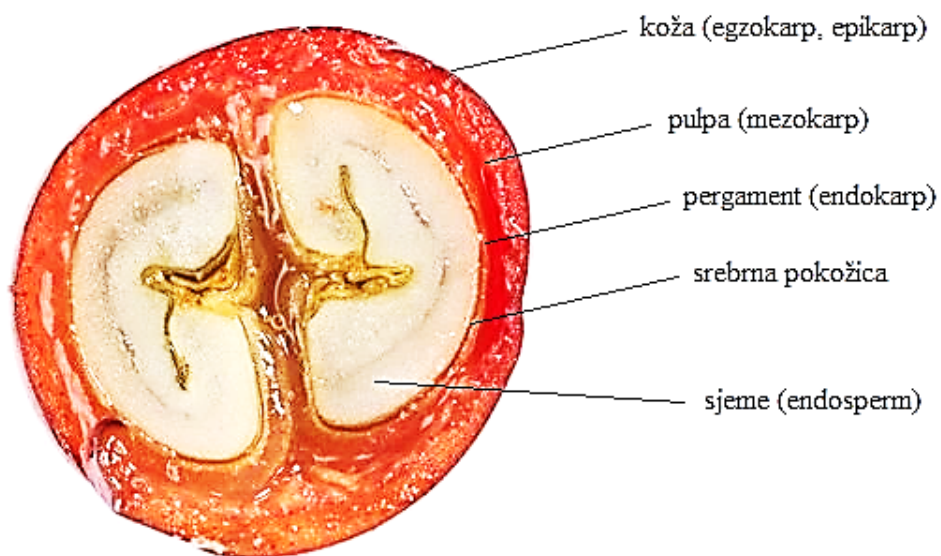
Industrija kave i dalje se razvija, pri čemu se istražuju nove tehnologije, pristupi i trendovi kako bi se zadovoljile promjenjive potrebe tržišta i postigla održivost u cijelom lancu opskrbe. Izvoz kave je industrija vrijedna 20 milijardi dolara, što je čini drugom robom kojom se najviše trguje, uglavnom konzumirana od strane industrijaliziranih zemalja, dok je proizvode manje razvijene zemlje. Ima dugačak i sveobuhvatan lanac robe koji uključuje proizvodnju, izvoz, uvoz, prženje, distribuciju i maloprodaju. Nakon žetve, kavu kupuju ili poljoprivrednici posrednici, ili izravno izvoze za velike kafiće i plantaže. Kava se zatim obično prodaje transnacionalnim tvrtkama za preradu i distribuciju kave po standardnoj stopi koju je odredila međunarodna agencija, New York Coffee Exchange. Industrija je od vitalnog značaja za politiku, opstanak i ekonomije za mnoge zemlje u razvoju. To je industrija monopolizirana od strane velikih transnacionalnih korporacija i lanaca. Industrija kave ima dugu povijest koja se može pratiti sve do 15. stoljeća, kada je Etiopija, porijeklo kave, izvozila kavu u Jemen. Trgovina kavom se ubrzo proširila na Egipat i Otomansko carstvo. S rastom trgovine između Republike Venecije i Otomanskog carstva, kava je uvedena u Europu, šireći se u Englesku, Francusku, Njemačku, Austriju i Nizozemsku. Uz europsku kolonijalnu ekspanziju, kava je uvedena u Ameriku i Aziju i ubrzo je postala važna industrija u raznim kolonijama, osobito u Južnoj Americi i Indiji. Industrija kave također je potaknula ropstvo u Južnoj Americi. Danas su vodeće zemlje proizvođača kave još uvijek na južnoameričkom kontinentu (1).

Kava je opći naziv za plodove i sjemenke biljke roda *Coffea*, uključujući i proizvode od tih plodova i sjemenki pripremljenih za potrošnju (2). Kava je zapravo zimzeleni grm koji raste iz zemlje, i može narasti u visinu čak do 10 metara, dok je prosječna visina oko 5 metara. Cvjetovi kave su nježno-bijele boje (Slika 1), a iz njih postupno nastaju plodovi na početku zelene boje, a sazrijevanjem im boja postaje žuta, a moguća je i crvena do crna boja.



**Slika 1.** Grm biljke kave (vlastita fotografija)

Kava se sastoji od nekoliko glavnih dijelova. Na **Slici 2** je prikazan presjek ploda kave i njegovi dijelovi. Vanjski sloj ploda kave naziva se koža (egzokarp, epikarp), a ispod kože nalazi se mekani i mesnati mezokarp ili pulpa. Nakon mezokarpa slijedi endokarp ili pergament koji služi kao tanki polisaharidni pokrov koji obuhvaća dva sjemena odnosno zrna kave koja su još dodatno prekrivena srebrnom pokožicom (**3**).



**Slika 2.** Građa zrna kave



## 1.2 Srebrna pokožica kave (SPK) kao sekundarna sirovina

Srebrna pokožica kave (**Slika 3**) tanak je sloj koji izravno pokriva zrno kave. Ona predstavlja oko 4,2 % zrna kave (**4**). Tijekom postupka prženja zrno kave 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 %). Trenutno se ovaj nusproizvod koristi kao gorivo, za kompostiranje i gnojidbu tla, a predstavlja i dobar izvor nekoliko bioaktivnih spojeva koji se mogu ekstrahirati i dalje koristiti u prehrambene, kozmetičke i farmaceutske svrhe (**5**).



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

SPK bogata je fenolnim spojevima, uglavnom klorogenskom kiselinom te drugim fitokemikalijama i bioaktivnim spojevima koji doprinose velikom antioksidacijskom kapacitetu. Iako je SPK bogata fenolnim spojevima, detektirana koncentracija je manja u usporedbi s prženim zrnom kave. Pretpostavlja se da je uzrok tome utjecaj visoke temperature na vanjski sloj zrna tijekom prženja, zbog čega dolazi do brze razgradnje fenolnih spojeva (**6**).

Također, sadrži velike količine ukupnih prehrambenih vlakana (oko 62 %), od čega 15 % čine topiva vlakna, a ostatak od 85 % ukupnih vlakana čine netopiva vlakna (**5**). Od netopivih vlakna prevladavaju celuloza, lignin i hemiceluloza, a od monosaharida tu su ksiloza, galaktoza, arabinoza i manoza (**2, 4**). Nije dokazana značajna razlika u sadržaju

prehrambenih vlakana između *C. arabica* i *C. canephora* u SPK. Zbog velike količine prehrambenih vlakana otvara se mogućnost korištenja SPK kao sirovine za razvoj funkcionalne hrane (4).

Vrijednosti pepela su visoke, što se pripisuje mineralima. Mineralni sastav sastoji se uglavnom od kalija, magnezija i kalcija (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).

Sadržaj proteina je zabilježen u značajnijim koncentracijama od oko 18 %. Ostali nutrijenti kao što su masti su pronađeni u manjim koncentracijama (5). Sadržaj kofeina u SPK nakon prženja kreće se oko 0,8 i 1,4 g/100 g, što je poprilično slično količini kofeina u zrnu kave (1,0-1,2 % u *C. arabica*, 1,6-2,5 % *C. robusta*) (8).

Akutna toksičnost vodenog ekstrakta SPK na štakorima s jednom dozom od 2000 mg/kg je istraživana u radu Iriondo-DeHond i sur., ali nisu primijetili nikakve znakove toksičnosti, abnormalnog ponašanja ili smrtnosti. Ekstrakt također nije pokazao citotoksičnost na MTT testu na HepG2 stanicama. Zatim su u tom istraživanju ispitnim štakorima oralnim putem dali otopinu SPK koncentracije 1 g/kg, nakon čega nisu uočeni negativni utjecaji na izlučivanje hormona niti antioksidativnih i protuupalnih biomarkera (4).

S obzirom na prehrambeni i kemijski sastav, antioksidacijsku aktivnost i sadržaj bioaktivnih spojeva, SPK se čini posebno zanimljivom kao proizvod koji bi se mogao koristiti 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 antioksidativne napitke koje je istraživao Mertinez-Saez i sur. sa svrhom kontrole tjelesne mase (9). SPK je potencijalni kandidat za zamjenu sintetičkih kemikalija kao aktivnih sastojaka u kozmetičkim formulacijama, zbog svog visokog antioksidativnog potencijala, fenolnih spojeva, melanoidina i kofeina (5).

Također, u Italiji sakupljaju SPK kao nusproizvod postupka prženja te ga pretvaraju u pelete i prodaju kao gorivo za grijanje (3). S druge strane, švedska grupa Löfbergs je uspostavila suradnju s tvrtkom koja se bavi 3D printanjem. Suradnja se temelji na tome da se otpad kave iskoristi za nove i modificirane proizvode i za potpuno novu svrhu. Teže tome da se do 2030. godine, u skladu s Agendom 2030 (10), otpad kave što više smanji te

da se uspostavi kružni ciklus iskorištavanja kave. Neki novi proizvodi su već formulirani, a pomoću nusproizvoda kave i to tako da koriste SPK i polipropilen, na temelju čega stvaraju trajni materijal i dizajniraju proizvode na kojima će se posluživati kava. Plan im je daljnjim razvojem upotrebljavati polipropilen iz recikliranih vrećica za kavu, time bi proizvodili postolja za posluživanje kave te učinili proizvodnju i iskorištavanje nusproizvoda kave 100 % kružnim ciklusom (11).

Zaključno, 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 istraživanja SPK treba razmotriti različite mogućnosti za iskorištavanje SPK, uključujući proizvodnju biogoriva, kozmetičke proizvode, prehrambene dodatke, materijale za pakiranje ili industrijske materijale. Potencijal tržišta za ove proizvode može utjecati na isplativost istraživanja.

Dalje je važno provjeriti postoji li potražnja na tržištu za proizvodima ili tehnologijama koje bi se razvile iz SPK. Analiza tržišta može pomoći u procjeni potencijalnog interesa potrošača i industrijskih kupaca.

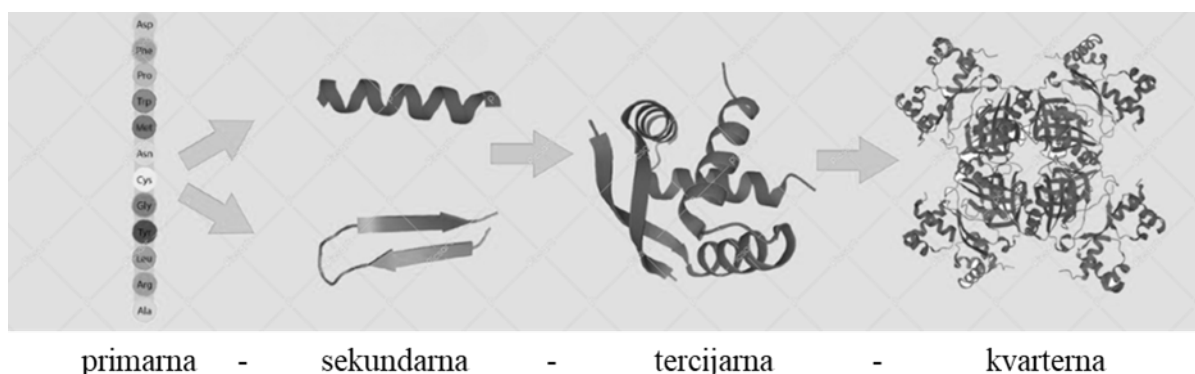
Razvoj tehnologija ili procesa za iskorištavanje SPK može zahtijevati značajna istraživanja i razvoj. Potrebno je procijeniti tehničke izazove i mogućnosti za inovacije kako bi se postigla isplativost, a isto tako treba razmotriti troškove istraživanja, razvoja i komercijalizacije tehnologija ili proizvoda koji se temelje na SPK. Ovi troškovi mogu utjecati na ukupnu isplativost projekta.

Treba uzeti u obzir 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 istraživanje i analiza 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 SPK kao izvor proteina

Proteini su polimerne molekule koje čine osnovnu građu svih živih organizama. Proteini nastaju povezivanjem aminokiselina peptidnom vezom u duge lance koji sadrže od 100 do 1000 aminokiselinskih ostataka. Proteini su sastavni dio svake stanice, nalaze se i u krvi čovjeka i životinja, gdje imaju funkciju transporta. Proteine izgrađuju aminokiseline, a 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 (Slika 4). 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  $\alpha$  – uzvojnica i  $\beta$  – nabrana ploča. Tercijarna struktura podrazumijeva trodimenzionalni prostorni raspored svih atoma polipeptidnog lanca. Kvaternu strukturu čini spajanje više peptidnih lanaca u definiranu molekulu (Slika 5).



**Slika 5.** Prikaz četiri razine strukture građe proteina

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).

SPK sadrži određenu količinu proteina, međutim ta količina može varirati ovisno o različitim čimbenicima kao što su sorta kave, način uzgoja, proces obrade i pripreme. Općenito, protein je jedan od sastojaka u kavi, ali nije dominantan poput kofeina ili ugljikohidrata. Međutim, uzimajući prosječni udio proteina u SPK oko 16 - 19 %, ipak se može smatrati dobrim izvorom proteina. Sadržaj ostalih komponenti koje je moguće izolirati iz SPK, poput fenola i vlakana, je nešto bolje istražen od proteina. Proteini se iz SPK ekstrahiraju i određuju jer predstavljaju veliki potencijal u proizvodnji funkcionalne hrane zbog svojih bioloških funkcija. Danas se razvija metoda ekstrakcije proteina iz SPK uz pomoć proteaza, gdje bi se istovremeno odvijala ekstrakcija i hidroliza proteina, uz eventualnu mogućnost paralelne ekstrakcije i polifenolnih komponenti. Peptidi koji se ekstrahiraju uz pomoć proteaza se proučavaju zbog antioksidacijskog i hipokolesterolemijskog učinka. Takvi peptidi su zapravo **funkcionalni peptidi**, odnosno kratak lanac aminokiselina koji ima specifične biološke funkcije u organizmu. Ti peptidi ne služe samo kao građevni blokovi proteina, već imaju određene biološke aktivnosti koje mogu utjecati na zdravlje ili metaboličke procese. Zbog toga se koriste 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 sur. (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 obično se ne koristi u ljudskoj prehrani, ali proteini u njoj mogu pružiti neku prehrambenu vrijednost kada se koriste u drugim procesima ili proizvodima poput biogoriva ili dodataka prehrani koji se mogu razviti u novim recepturama za nutritivno obogaćene proizvode. Proteini u SPK mogu biti potencijalni alergeni za neke ljude. Ako se SPK ne ukloni tijekom obrade kave, postoji mogućnost da bi neki konzumenti mogli imati reakciju na ove proteine. 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.

Načelno se može reći kako je udio proteina u SPK obično nizak i da se SPK obično uklanja i odbacuje tijekom standardnog procesa obrade kave.

## 1.4 SPK 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 jedni od najraširenijih prirodnih spojeva u biljnom svijetu i poznato je više od 8000 različitih polifenola. Djeluju kao jaki antioksidansi i mogu doprinijeti prevenciji kroničnih nezaraznih i autoimunih bolesti. Molekule polifenola su građene od najmanje jednog aromatskog prstena s jednom ili više hidroksilnih skupina. Osim hidroksilnih, na polifenole mogu biti vezane i sulfatne ili acetilne skupine. Polifenoli su uglavnom vezani na druge molekule poput ugljikohidrata. Dijele se na flavonoidne i neflavonoidne spojeve (**Slika 6**). Dosadašnja istraživanja su pokazala da SPK sadrži značajne količine polifenola, premda se točne vrijednosti mogu razlikovati ovisno o čimbenicima odnosno vrsti kave, uvjetima prženja (temperatura i trajanje prženja) te metodama obrade (**15**). SPK je svakako bogata polifenolima, osobito klorogenskom kiselinom, koja je ključni antioksidativni spoj. Ova svojstva čine je potencijalno korisnim sastojkom za funkcionalne namirnice, dodatke prehrani ili kozmetiku, a njezina antioksidativna aktivnost također je važan faktor u istraživanju njezine primjene u industriji. Antioksidansi pomažu u neutralizaciji slobodnih radikala u tijelu, što može smanjiti rizik od kroničnih bolesti poput kardiovaskularnih bolesti i raka te u tom smjeru se kreću novija istraživanja za koja je ipak prethodno potrebno provesti detaljnije ekonomske analize isplativosti. 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 aromatskog prstena, a tu spadaju flavoni, flavon-3-oli, izoflavoni, antocijanidini, flavanoni i flavanoli. Polifenoli su već od ranije poznati kao spojevi koji imaju cijeli niz pozitivnih učinaka na metabolizam i zdravlje čovjeka. Imaju 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. Pokazalo se kako polifenoli pokazuju pozitivno djelovanje kod kardiovaskularnih oboljenja, gdje ograničavaju aterosklerotička oštećenja tkiva. Smatra se da ateroskleroza nastaje zbog povećanja koncentracije i oksidacije LDL-a (engl. *low-density lipoprotein*) 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).

### 1.5 Biološki učinci pesticida

Pesticidi su spojevi ili kemikalije namijenjeni eliminaciji, suzbijanju ili upravljanju štetnim organizmima koji mogu ugroziti usjeve, biljke, stoku ili druge korisne organizme. Ti štetni organizmi mogu uključivati insekte (insekticide), korov (herbicidi), gljivice (fungicide), štetočine (rodenticide) i razne mikroorganizme (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).

U modernom svijetu, zbog konstantnog povećanja broja stanovnika, postoji i povećana potreba za proizvodnjom velike količine hrane te osiguranja dostupnosti te hrane kroz cijelu godinu. Da bismo mogli proizvoditi voće i povrće kroz svako godišnje doba te da bi osigurali velike prinose istih, koriste se pesticidi, odnosno sredstva za zaštitu bilja. Na prinos biljaka neprestano utječu štetni organizmi, stoga je prijeko potrebno zaštititi biljke i od takvih organizama kako bi osigurali kvalitetu ubranih proizvoda i visoku poljoprivrednu produktivnost. U tu svrhu dostupne su različite metode, kemijske i one koje nisu kemijske,

kao što su uporaba otpornih sorti, rotacija usjeva, mehaničko plijevljenje, biološka kontrola.

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 sigurnom 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. Ovi MRO-i, koje je utvrdila Europska komisija, uključuju MRO-e karakteristične za određene proizvode namijenjene za prehranu ljudi ili kao hrana za životinje te općeniti MRO koji se primjenjuje ako ne postoji poseban MRO („zadana vrijednost” od 0,01 mg/kg).

U kemijske metode spada uporaba sredstava za zaštitu bilja sukladno Uredbi. Primjena pesticida može predstavljati neke opasnosti i rizike, kako za okoliš tako i za ljudsko zdravlje. Najvažnija opasnost je toksičnost jer su mnogi pesticidi kemijski spojevi koji imaju potencijalnu toksičnost za ljude, životinje i korisne organizme. Nepropisna primjena ili izlaganje pesticidima može uzrokovati akutne ili kronične zdravstvene probleme, uključujući iritaciju kože i očiju, glavobolje, vrtoglavicu, mučninu i dugoročne zdravstvene probleme poput neuroloških poremećaja i raka. Osim toga, veliki je utjecaj i na onečišćenje okoliša. Pesticidi se mogu isprati s polja u okolna tla i vode ili se mogu proširiti zrakom. Ovo može uzrokovati onečišćenje tla, voda i zraka te imati štetne učinke na biljni i životinjski svijet, uključujući smanjenje bioraznolikosti i štetu ekosustavima. Redovita uporaba pesticida može dovesti do pojave rezistentnosti kod ciljanih štetnih organizama, poput insekata, korova ili gljivica. To znači da ti organizmi postaju otporniji na djelovanje pesticida, što zahtijeva veće količine ili jače kemikalije za njihovu kontrolu. Pesticidi mogu



imati negativne učinke na korisne organizme, poput pčela, ptica, riba i drugih predatora štetnika. Njihovo trovanje pesticidima može dovesti do smanjenja njihove populacije, što može imati dalekosežne posljedice na ekosustave.

Konačno, tu su mogući i problemi s odlaganjem. 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 uporabe 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 dospijevaju 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 održivu proizvodnje odnosno održivost staništa i ekosustava lokalnog stanovništva (22).

## 1.6 Biološki učinci teških metala

U različitim fazama i okolnostima proizvodnog procesa, različiti metali i njihove slitine (legure) dolaze u dodir s hranom, i to putem procesne opreme, pripreme (pribora) i čuvanja hrane (kao npr. metalna ambalaža: folije, limenke, spremnici, kontejneri i sl.). Osim potencijalnih elektro-kemijskih reakcija, potrošači mogu biti dovedeni u opasnost ako ukupna koncentracija metala prijeđe preporučena ograničenja ili mogu dovesti do raznih neželjenih organoleptičkih promjena namirnica. Naravno, osim što u dodir s hranom dolaze tijekom procesa proizvodnje, zatim tijekom pripreme i čuvanja, neki metali u hranu dospijevaju iz okoliša, odnosno iz vode i tla te se dalje prenose hranidbenim lancem ili se mogu u hrani već nalaziti u obliku esencijalnih minerala (23).

Veliki i najpoznatiji dio grupe metala su teški metali. Prva asocijacija na pojam teški metali je uglavnom nešto opasno i štetno, no to u stvarnosti ne mora biti tako. Teški metali su skupina metala koji se definiraju kao elementi koji imaju gustoću veću od  $5 \text{ g/cm}^3$ . Stoga se u tu skupinu ubraja jako velik broj metala od kojih su neki esencijalni odnosno elementi u tragovima važni za funkcioniranje ljudskog organizma, ali i oni neesencijalni, tj. štetni metali (24). Teški metali koliko su važni i neophodni za prirodu i čovjeka, međutim jednako toliko mogu imati i vrlo štetan učinak. Dijele se u dvije glavne skupine: esencijalne (bakar, cink, mangan, željezo, molibden, selen) i neesencijalne (olovo, živa, kadmij, arsen, aluminij, kositar, kobalt, paladij, platina). Esencijalni teški metali su važni za pravilno obavljanje bioloških procesa u organizmu, a smanjenjem količine kao i prekomjernom količinom tih metala može doći do poremećaja u tijelu. U najgorim slučajevima mogu dovesti do teških deformacija, kome i smrti. U organizam se unose udisanjem, apsorpcijom kroz crijeva te apsorpcijom kroz kožu, ovisno o njihovom kemijskom obliku. Toksičnost takvih metala ovisi o njihovoj koncentraciji (količini) u organizmu. Prekomjerne razine teških metala uzrokuju značajna oštećenja svakog organa u tijelu i mogu pokazati različite poremećaje pamćenja, neurološke nedostatke, respiratorne poremećaje, karcinogenost, GI (gastro-intestinalnu) opstrukciju, osteoporozu itd. Otpadna ambalaža koja sadrži teške metale može završiti na odlagalištima ili u prirodi, a to može dovesti do onečišćenja tla, te širenja toksičnih tvari. Naposljetku teški metali imaju štetan utjecaj na sav živi (biljni i životinjski) svijet, a akumulacijom istih preko hranidbenog lanca dolaze do čovjeka (25). Zbog svoje postojanosti, visoke otrovnosti i sklonosti da se akumuliraju u ekosustavu, teški su metali opasni za žive organizme. Teški metali u hrani mogu imati ozbiljne negativne

učinke na zdravlje ljudi. Neki od tih metala, poput olova, žive, kadmija i arsena, mogu se nakupiti u tijelu tijekom vremena, potaknuti različite zdravstvene probleme koji se mogu pogoršati.

Teški metali koji djeluju isključivo toksično i nisu biogeni su kadmij, olovo i živa. Njihova toksičnost ovisi o nekoliko čimbenika, uključujući dozu, način izlaganja i kemijsku vrstu, kao i starost, spol, genetika i stil života. Zbog visokog stupnja toksičnosti osim kadmija, olova i žive, od velikog značaja su i arsen i krom (26). Ako dođe do trovanja teškim metalima između ciljnih organa na koje djeluju teški metali, posebno su osjetljiva tkiva poput bubrega, jetre i centralnog živčanog sustava. Metali pokazuju afinitet za razne ligande organskih molekula, posebice proteina. Stanična membrana s mnogo osjetljivih liganada (proteina) prvi je stupanj u djelovanju metala, zbog čega može doći do promjene u raspodjeli iona, promjene transmembranskog potencijala, blokiranje aktivnog transporta ili čak do potpunog razaranja membranske strukture (27).

Nije dopušteno na tržište staviti hranu koja sadrži nedozvoljenu odnosno štetnu količinu kontaminanata u hrani. S obzirom na to da je utvrđeno da se teški metali prenose hranidbenim lancem, njihova se prisutnost očekuje u tlu i vodi odakle će ih crpiti biljke, a zatim i životinje te preko kojih će završiti u probavi čovjeka (28). Iz tog razloga potrebno je pratiti koncentracije esencijalnih metala, kao i koncentracije neesencijalnih, tj. toksičnih metala u okolišu. Još jedan razlog zašto je vrlo važno pratiti koncentracije teških metala u hrani je taj što razna istraživanja tvrde da teški metali mogu biti kancerogeni, mutageni i teratogeni.

Prilikom analize kontaminanata u hrani u RH koristi se Zakon o kontaminantima (NN 39/2013 i 114/2018) (29), a u tu skupinu se ubrajaju i svi metali i nemetali. Na razini EU to je Uredba komisije (EU) 2023/915 od 25. travnja 2023. 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.

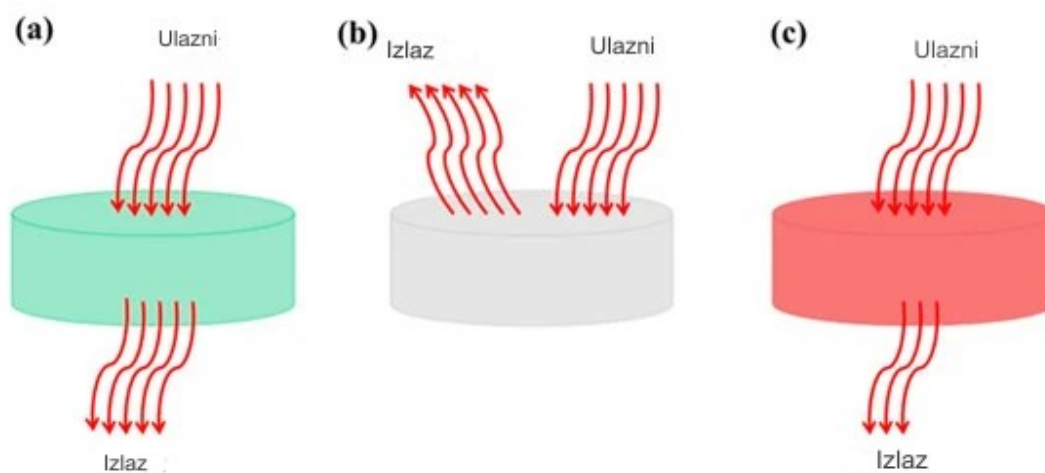
Iz navedenog proizlazi potreba za strogim praćenjem i analizom svih kontaminanata, a pravo EU-a osigurava da se poslovni subjekti moraju pridržavati obvezujućih propisa. Propisi mogu imati opći opseg, tj. primjenjivati se na sve materijale i predmete koji dolaze u dodir s hranom ili se primjenjivati 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 kojem je najviša dopuštena količina (NDK) metala ili metaloida u kavi za olovo (Pb) je 1,0 mg/kg, a za arsen (As) također 1,0 mg/kg (31).

## **1.7 Mikrovalna ekstrakcija (engl. *Microwave-assisted extraction, MAE*)**

### **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 jer učinkovito djeluju na određene materijale, pretvarajući svoju elektromagnetsku energiju u toplinsku energiju u samom materijalu. Mikrovalovi se sastoje od dva okomita oscilirajuća polja - električnog i magnetskog polja. Zagrijavanjem materijala stvara se električno polje. 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, a ovisi o temperaturi i frekvenciji 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 reaguju na djelovanje mikrovalova, nepolarne komponente reflektiraju mikrovalno zračenje, dok ih polarni spojevi apsorbiraju (Slika 7).



**Slika 7.** Djelovanje mikrovalova na različite vrste materijala (adaptirano prema: (34))

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

### 1.7.2 Primjena mikrovalova u industriji

Mikrovalovi danas imaju široku primjenu u analitičkoj kemiji te velikom broju industrija: automobilske, tekstilne, industrije 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 (35). 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 Maillardove reakcije 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).

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, 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). Različiti parametri utječu na mikrovalnu ekstrakciju, poput jačine mikrovalova, njihove frekvencije, vremena

izlaganja mikrovalovima, zatim udjela vlage, veličine čestica i sastava uzorka, vrste otapala, temperatura, tlak i sl. (40). Svi ovi parametri utječu na uspješnost ekstrakcije mikrovalovima.

Različiti materijali se također različito ponašaju djelovanjem utjecaja mikrovalova:

- nepolarni materijali reflektiraju mikrovalove,
- mikrovalovi prolaze kroz staklo, porculan i keramiku,
- hrana, ljudsko tkivo i polarni materijali ih apsorbiraju

Glavne prednosti mikrovalne ekstrakcije su smanjenje vremena ekstrakcije i smanjenje upotrebe otapala 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). Zatim je nedostatak i potreba za hlađenjem posude za mikrovalnu ekstrakciju nakon ekstrahiranja na sobnu temperaturu prije otvaranja, čime nastaje gubitak vremena koje se dobiva ovom brzom metodom ekstrakcije. Također postoji potreba za razdvajanjem ekstrakta od uzorka dekantiranjem, filtriranjem ili centrifugiranjem.



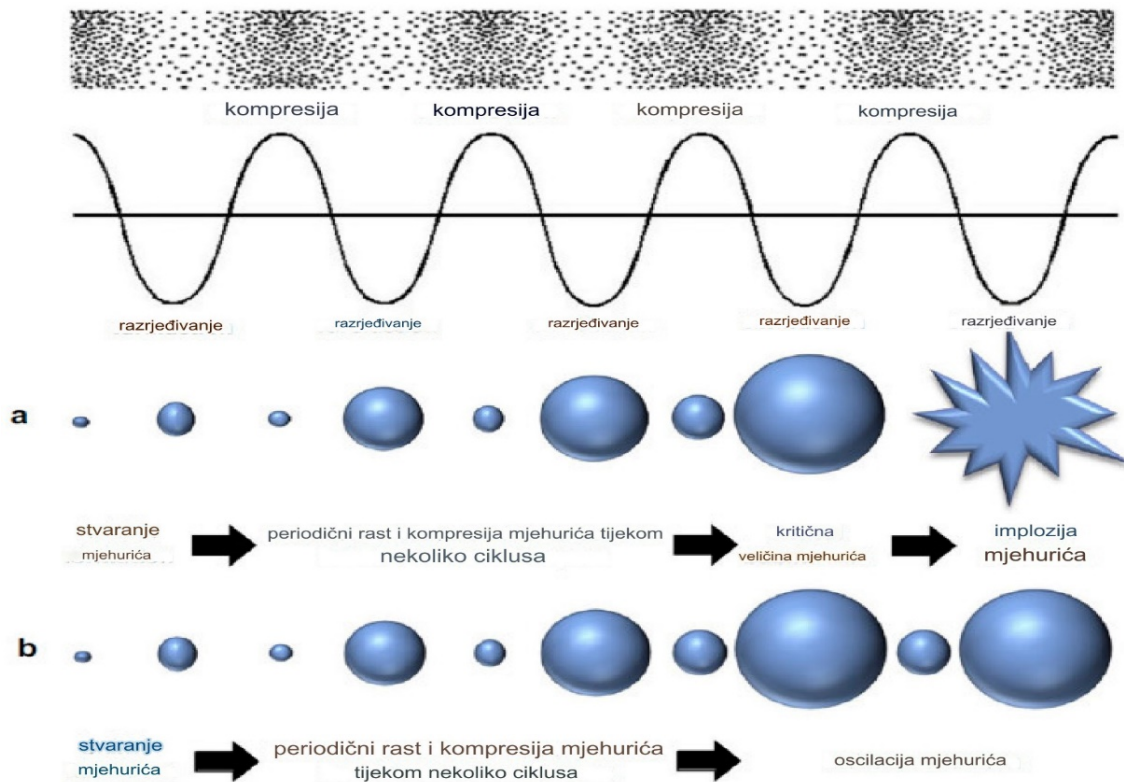
## 1.8 Ultrazvučna ekstrakcija (engl. *ultrasound-assisted extraction*, UAE)

### 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 ( $\alpha$ ) koji ovisi o svojstvima materijala kroz koji ultrazvuk prolazi.

Ultrazvučna ekstrakcija 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 kolapsiraju 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 ( $W\text{ sm}^{-3}$ ), snazi (W) i intenzitetu zvučnih valova ( $W\text{ m}^{-2}$ ) (42). Ultrazvuk niske energije i niskog intenziteta (nižeg od  $1\text{ W cm}^{-2}$ ), 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  $1\text{ W cm}^{-2}$ ), 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 tog mjehurića. Pritom dolazi do stvaranja regija vrlo visoke temperature (5500 K) i tlakova (100 MPa) (Slika 8) što dovodi do promjena fizikalno-kemijskih svojstava lokalnih molekula (44, 45).



**Slika 8.** Usporedba ciklusa kompresije i ekspanzije s formiranjem, rastom i implozijom kavitacijskog mjehurića (adaptirano prema (45))

Najvažniji faktor 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, što dovodi do poprilično ograničenog raspona temperature (47). Kavitacija uzrokuje depolimerizaciju koja je u određenim procesima poželjna; smanjenju viskoznosti. Istraživanja su pokazala kako primjenom ultrazvuka dolazi do smanjenja viskoznosti bez promjene u kemijskog 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. Dolazi do prijenosa mase tvari odnosno 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). Ultrazvučna ekstrakcija 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 stijenu. Kavitacija uzrokuje bubrenje stanica i probijanje staničnih stijenki, čime se omogućava brža difuzija i ispiranje komponenti iz stanice. Rezultat toga je brža i efikasnija ekstrakcija. Cilj primjene ultrazvučne ekstrakcije 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“. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom troši samo dio fosilne energije koja se inače koristi u konvencionalnim metodama ekstrakcije poput Soxhleeta, maceracije, centrifugiranjem ili destilacijom vodenom parom (50).

### **1.8.2 Primjena ultrazvuka u industriji**

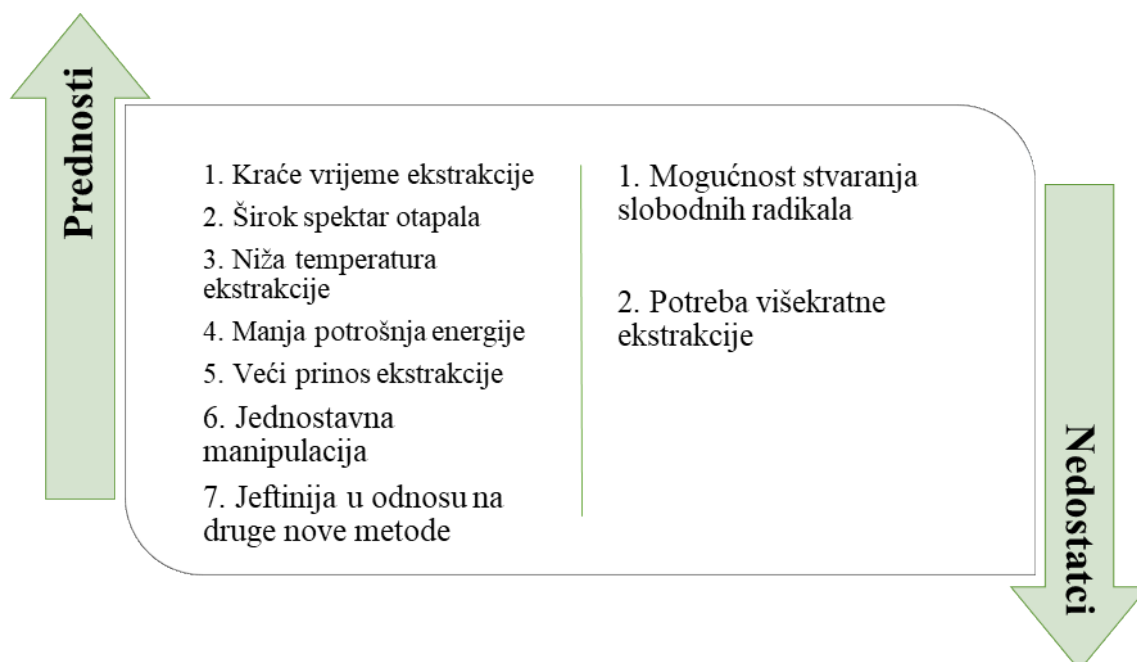
Uređaji koji se primjenjuju za ultrazvučnu ekstrakciju predstavljaju ključnu ulogu u vođenju procesa. Uz njihovu pomoć moguće je kontrolirati glavne parametre procesa kao što su gustoća zvučne energije, snaga, intenzitet i način rada. Ultrazvučni uređaji dolaze u obliku dvije izvedbe: ultrazvučna kupelj i ultrazvučna sonda. 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. Stoga je nastala zvučna energija niskog intenziteta. Za razliku od kupelji ultrazvučna sonda se uranja u otapalo i vrši direktnu distribuciju ultrazvuka u mediju. Pritom su gubici energije svedeni na minimum, ultrazvučne sonde znatno su manje površine i generiraju valove većeg intenziteta. Prilikom odabira uređaja treba uzeti u obzir vrstu sonde i dizajn reaktora koji mogu utjecati na uspješnost ekstrakcije (51).

U industriji ultrazvučna ekstrakcija se primjenjuje za izolaciju polifenola, antocijana, aromatskih tvari, polisaharida, pigmenata, ulja i funkcionalnih spojeva. No, kako bi se

povećala njena primjena u industriji potrebno je zajamčiti njenu sigurnost, održivost, isplativost i ekološku prihvatljivost (48). Prednost primjene ove metode je što se mogu koristiti vodene otopine odnosno tzv. “zelena otapala“ koja su sigurnija i ekološki prihvatljivija od dosadašnjih organskih otapala. Najčešća „zelena otapala“ su: voda, terpeni, biljna ulja, agrootapala, superkrični fluidi, ionske kapljevine, prirodna eutektička otapala i slično. Spomenuta metoda se pokazala izvrsnom kada se radi o skupim sirovinama jer je ekonomičnija; veći je prinos i kraće vrijeme ekstrakcije (52).

Osim već spomenutih parametara, na uspješnost ekstrakcije utječu temperatura, vrijeme trajanja tretmana, veličina čestica i slično (46).

Prednosti i mane primjene ekstrakcije potpomognute ultrazvukom prikazane su na **Slici 9**.



**Slika 9.** Usporedba prednosti i nedostataka ultrazvučne ekstrakcije

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 trenutno 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 (engl. *Life Cycle Analysis, LCA*)

Analiza životnog ciklusa (LCA) je metodološki okvir za procjenjivanje utjecaja životnog ciklusa proizvoda dobivenog različitim tehnoloških procesima i operacijama na okolinu. Ova metoda je primjenjiva i za optimizaciju utjecaja djelovanja tvrtke na okolinu. Ukupni LCA određenog proizvoda uključuje: dobivanje sirovina za proizvod, proizvodnja, distribucija i primjena proizvoda, odlaganje proizvoda nakon primjene (otpad) i transport proizvoda između pojedinih faza ciklusa (54). LCA procedura je dio ISO 14000 standarda za prihvatljivo gospodarenje okolišem (55). Standardi koji se također odnose na tu analizu: ISO 14040: Principi i metoda

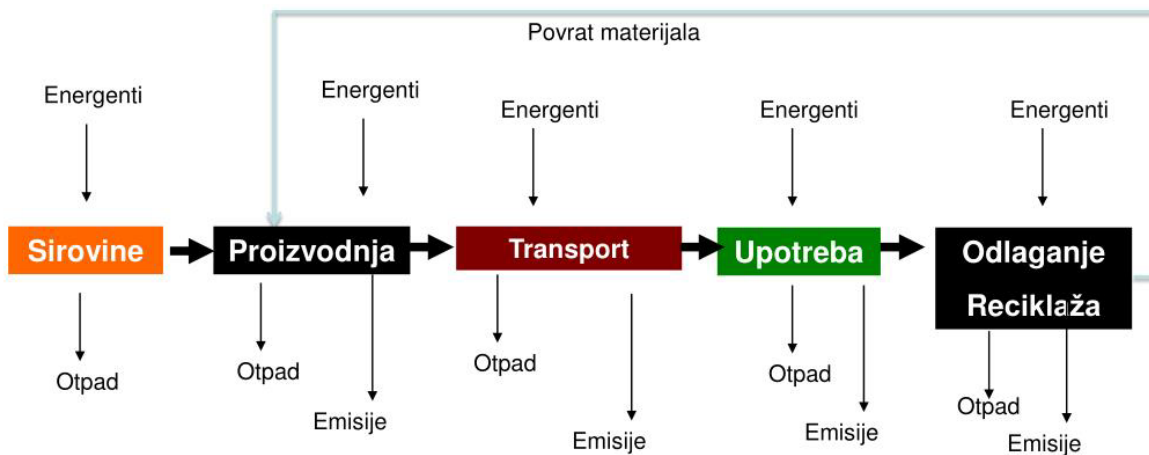
ISO 14041: Cilj, područje analize i analiza inventara

ISO 14042: Procjena utjecaja

ISO 14043: Interpretacija životnog ciklusa

ISO 14047-14049: Primjeri procjene utjecaja i opreme kao i pravila dokumentacije

LCA analiza se izrađuje u industrijskom sektoru kako bi se identificirala područja gdje su mogući napreci u smislu očuvanja okoliša. Alternativno, LCA može biti koristan za pružanje podataka javnosti ili vladi o utjecaju određenog područja, regije ili države na okoliš. Mnoge tvrtke izrađuju LCA i izlažu podatke dobivene LCA analizom kako bi dokazali ekološku prihvatljivost svojih proizvoda. LCA analiza se koristi i za formiranje novih procesa ili proizvoda, za edukaciju i za etiketiranje odnosno deklariranje proizvoda. LCA također predstavlja veliku ulogu u zbrinjavanju otpada i zagađenja okoliša. Prema standardu ISO 14000, LCA sastoji se od četiri glavne faze: određivanje ciljeva i područja rada, detaljna analiza odabranog sustava, procjena utjecaja na okolinu i interpretacija rezultata, tako da treba sve parametre uzimati u obzir kao u primjeru na **Slici 10**.



**Slika 10.** Primjer općenitog LCA procesa

### 1.9.1 Faze analiza životnog ciklusa proizvoda

U prvoj fazi analize se određuje svrha i opseg analize (engl. *"Goal and scope definition"*) odnosno odabire se područje rada tj. proces i proizvod, vrsta LCA analize koju ćemo koristiti i funkcionalna jedinica. Vrste LCA podijeljene na detaljnost praćenja sirovine i proizvoda od početka pa do finalnog proizvoda ili aktivnosti. U ovoj fazi se također opisuju metode za procjenu potencijalnog utjecaja na okolinu te u koju kategoriju utjecaja pripadaju (56).

U drugoj fazi prikupljamo podatke i modeliraju se sustavi dobivanja određenog proizvoda (engl. *"Life cycle inventory analysis"*, LCA), opisa sustava i procjene podataka. Podaci uključuju sve informacije koje se odnose na sve kategorije utjecaja na okolinu (dobivanje ugljičnog dioksida, procesne podatke i količine za svaku pojedinu fazu procesa proizvodnje. Podaci se iz ove faze moraju odnositi na funkcionalnu jedinicu proizvoda definiranu u ciljevima i svrsi LCA analize. Ulazne i izlazne vrijednosti mase i energije se integriraju i kvantificiraju preko ukupnog životnog ciklusa sustava (Technical Committee ISO/TC 207, 1997) (57).

U trećoj fazi se određuje utjecaj na okoliš (engl. *"Life cycle impact assessment"* – LCIA). Sastoji se od vrednovanja potencijalnih utjecaja sustava na okoliš i ljudsko zdravlje. Definira se metodologija utjecaja i kategorije utjecaja na okolinu (npr. globalno zatopljenje, eutrofikacija, opasnost oboljenja od raka). Na osnovi LCI rezultata se izračunavaju potencijalni utjecaji. Zatim se provodi normalizacija i procjena (vaganje) pojedinog utjecaja prema ISO standardima.

Zadnja faza analize životnog ciklusa 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 (LCA) i/ili faze određivanja utjecaja na okoliš (LCIA). 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 uglavnom 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 proces (58).

### **1.9.2 Indeks održivosti procesa (engl. *Sustainable Process Index, SPI*)**

Indeks održivosti procesa je jedan od načina za kvalitativno i kvantitativno izražavanje utjecaja na okoliš određenog proizvoda ili samog procesa proizvodnje. Indeks održivosti procesa (SPI) ima fokus na samu održivost procesa s ekološkog i ekonomskog stajališta te na tehnološka rješenja u svrhu poboljšanja održivosti procesa. Bilance 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

Kružno gospodarstvo je model proizvodnje i potrošnje koji obuhvaća posudbu, ponovno korištenje, dijeljenje, popravljavanje, 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. Mnoga poduzeća su iskoristavala linearni model proizvodnje za maksimiziranje profita, svjesno skraćujući vijek proizvoda kako bi potrošači bili prisiljeni kupovati novi proizvod. Korištenjem modela proizvodnje kružno gospodarstvo produljuje se životni vijek proizvoda, što je učinkovito rješenje u postizanju ekoloških ciljeva.

Na **Slici 11** je prikazan kružni ciklus od resursa preko proizvoda (proizvodnje), plasiranja, uporabe, odlaganje i ponovnu upotrebu.



**Slika 11.** Osnovni koncept kružnog gospodarstva

### 1.10.1 ISO standardi niza ISO 59000

Serijski dokumenti standarda ISO 59000:2024 (60) osmišljena je za usklađivanje razumijevanja kružnog gospodarstva te za podršku njegovoj provedbi i mjerenju. Cilj je standardizacija u području kružne ekonomije, stvaranje okvira, zahtjeva, smjernica i alata podrške za provedbu aktivnosti svih uključenih organizacija, kako bi se maksimizirao njihov doprinos sustavu održivog razvoja. Aspekti kružnog gospodarstva koje već



pokrivaju drugi postojeći odbori nisu uključeni, ali se međusobno nadopunjavaju. Također, ključni motivirajući čimbenik za ISO standard bio je pokušaj postizanja konsenzusa i smanjenja rizika od raznih nesporazuma. Kružno gospodarstvo postaje strateški sve važnije za tvrtke. Jedan od bitnih razloga je i smanjenje rizika od greenwashinga (hrv. „zeleni sjaj“), a što je oblik oglašavanja ili marketinškog spina u kojem se „zeleni PR“ i „zeleni marketing“ prijevarno koriste kako bi se javnost manipulativno uvjerila da su proizvodi, ciljevi i politike organizacije ekološki prihvatljivi i provjereni, a što ne odgovara istini. U **Tablici 1** su prikazani ISO standardi niza 59000, koji su izdani u svibnju 2024.

**Tablica 1.** ISO standardi serije 59000

<b>ISO 59004:2024 - Kružno gospodarstvo – terminologija, načela i smjernice za provedbu</b>	
<b>ISO 59010:2024</b>	Kružna ekonomija – Smjernice o poslovnim modelima i mrežama vrijednosti
<b>ISO 59020:2024</b>	Cirkularna ekonomija – Mjerenje i procjena kružnosti
<b>ISO 59004:2024</b>	Cirkularna ekonomija – List s podacima o kružnosti proizvoda
<b>ISO 59014:2024</b>	Upravljanje okolišem i kružno gospodarstvo – Načela, zahtjevi održivosti i sljedivosti uporabe sekundarnih materijala
<b>ISO TR 59031</b>	Cirkularna ekonomija – Pristupi temeljeni na učinku
<b>ISO TR 59032</b>	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 12.** i podržavaju organizacije u provedbi tranzicije u kružnom gospodarstvu.



**Slika 12.** Veza između ISO standarada niza ISO 59004, ISO 59010 i ISO 59020 (adaptirano prema (61))

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 trenutne i buduće ljudske potrebe (dobrobit, stanovanje, prehrana, zdravstvena skrb, mobilnost itd.), postoji povećano razumijevanje da tranzicija prema gospodarstvu koje je više kružno, temeljeno na kružnom toku resursa, može stvoriti i dijeliti više vrijednosti s društvom i njegovim dionicima, dok se prirodnim resursima upravlja i obnavlja na održiv način, dok se pri tome osigurava kvaliteta i otpornost ekosustava. Organizacije prepoznaju mnoge potencijalne razloge za uključivanje u kružno gospodarstvo, npr. pružanje konkurentnijih i održivijih rješenja; poboljšani odnosi s dionicima; učinkovitiji i 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, dok pridonosi zadovoljenju ljudskih potreba.

### 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 analiza životnog ciklusa (LCA). LCA procjenjuje sve faze životnog ciklusa proizvoda, od ekstrakcije sirovina do proizvodnje, distribucije, uporabe i odlaganja, kako bi se utvrdili njegovi ekološki utjecaji.

Kada se radi o izračunavanju ukupnog ekološkog otiska proizvoda, važno je uzeti u obzir sve relevantne faktore, uključujući:

**Proizvodnju:** Utjecaj na okoliš proizvodnje uključuje potrošnju energije, emisije stakleničkih plinova, potrošnju vode, uporabu kemijskih supstanci i druge faktore povezane s proizvodnim procesom.

**Distribuciju:** Transport proizvoda može pridonijeti emisijama stakleničkih plinova i potrošnji goriva. Uzimaju se u obzir i pakiranje i ambalaža te njihov utjecaj na okoliš.

**Uporabu:** Potrošnja energije i vode tijekom uporabe proizvoda, kao i eventualna emisija štetnih tvari tijekom korištenja, mogu biti značajan dio ukupnog ekološkog otiska.

**Odlaganje:** 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 (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 utjecaj na Zemlju samo kroz 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. Zatim, 2014. godine, čelnici EU 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 (EP) 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.

EK je u ožujku 2020. predstavila prijedlog Europskog zakona o klimi koji je stupio na snagu u srpnju 2021. godine. Predloženi pravni akt jest Uredba (EU) 2021/1119 EP i Europskog vijeća (EV) o uspostavi okvira za postizanje klimatske neutralnosti i o izmjeni uredaba br. 401/2009 i 2018/1999, te predstavlja važno sredstvo za razvijanje europskog klimatskog prava u kontekstu okoliša koje pripada u podijeljenu nadležnost EU i samih

država članica (67).

Naime, uredbom se uspostavlja okvir za postizanje klimatske neutralnosti u Europskoj uniji (EU) do 2050. (odnosno uravnoteživanje emisija i uklanjanja stakleničkih plinova koji se odnose na cijeli EU i uređeni su pravom EU-a); uz obvezujući cilj klimatske neutralnosti u EU-u do 2050., uključuje cilj ostvarivanja negativnih emisija u EU-u, nakon toga omogućuje utvrđivanje obvezujućeg cilja EU-a u pogledu neto domaćeg smanjenja emisija stakleničkih plinova do 2030. za najmanje 55 % (u odnosu na razine iz 1990.) i utvrđivanje klimatskog cilja za 2040.

EU je zakonski obvezala na smanjenje emisija stakleničkih plinova kako bi postigla klimatsku neutralnost (ugljična neutralnost) do 2050. godine, odnosno ravnotežu između količine emitiranog ugljikovog dioksida i njegove apsorpcije iz atmosfere u tzv. ponore ugljika. Međutim, globalne godišnje emisije CO<sub>2</sub> 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 deset tisuća elektrana i tvornica na posjedovanje dozvola za svaku tonu emitiranog CO<sub>2</sub>. Tvrteke 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).

Usljed gospodarske krize i pada potražnje na tržištu 2008. godine, dozvole za emisijske jedinice postale su povoljne gospodarskim subjektima. Kao posljedica niskih cijena, tvrtke su prestale s ulaganjem u zelene tehnologije što je utjecalo i na borbu protiv klimatskih promjena i EU ETS sustav za trgovanje emisijama. Slijedom toga, 2015. godine nametnulo se rješenje za stvaranjem rezervi za stabilnost tržišta (engl. *Market Stability Reserve, MSR*) kojima bi se omjer ponude i potražnje emisijskih jedinica uskladio. U rezervu je stavljeno

24 % EU ETS emisijskih jedinica, koje se mogu osloboditi u slučaju nestašice. U ožujku 2023. godine rezerva za stabilnost tržišta produžena je do 2030. godine s ciljem da se EU zaštiti od pada cijena dozvola uslijed oscilacija na tržištu uzrokovanih pandemijom bolesti COVID-19, sve kako bi postojala daljnja tendencija smanjenja emisija stakleničkih plinova. Europska unija je 2003. donijela Direktivu 2003/87/EZ kojom se uspostavlja sustav trgovanja emisijskim jedinicama stakleničkih plinova. Sustavom se omogućuje gospodarskim subjektima da provedbom troškovno učinkovitih mjera smanje emisije stakleničkih plinova. To se postiže izdavanjem dozvola za emisije stakleničkih plinova postrojenjima, te raspodjelom točno određene količine emisijskih jedinica sukladno zadanim kriterijima.

ETS je međunarodni sustav za trgovanje emisijama stakleničkih plinova u Europskoj Uniji. Uspostavom ETS-a (zasnovan na EU Direktivi 2003/87/EC) se želi omogućiti provedba mjera gospodarskih subjekata obuhvaćenih ETS-om na troškovno učinkovit način, a s ciljem izvršenja obveza preuzetih Kyotskim protokolom. Prvenstveno se želi da države članice ograniče ukupne emisije stakleničkih plinova iz postrojenja obuhvaćenih ETS Direktivom na vlastitom području, te s tom svrhom svakom operateru postrojenja izdati rješenje za emitiranje točno određene količine emisije u obliku dodjele besplatne emisijske kvote, odnosno određenog iznosa prava na emisiju, pri čemu jedno 'pravo na emisiju' predstavlja dozvolu za emisiju jedne tone CO<sub>2e</sub>. Uspostavi sustava trgovanja emisijskim jedinicama stakleničkih plinova prethodila je izrada Plana raspodjele emisijskih kvota stakleničkih plinova u RH (NN 76/2009) kojeg je donijela Vlada RH u lipnju 2009. godine. Planom su obuhvaćeni gospodarski subjekti koji su, sukladno Prilogu I Uredbe o emisijskim kvotama stakleničkih plinova i načinu trgovanja emisijskim jedinicama, obveznici ishođenja dozvole za emisije stakleničkih plinova, ukupno 81 postrojenje.

Od 1. siječnja 2005. do 31. prosinca 2007. godine bilo je prvo razdoblje trgovanja – tzv. probno razdoblje (priprema za mehanizam međunarodnog trgovanja emisijama stakleničkih plinova u skladu s Kyotskim protokolom). U siječnju 2008. je započelo tzv. drugo razdoblje trgovanja koje traje 5 godina i poklapa se s prvim obvezujućim razdobljem Kyotskog protokola. U RH zakonske osnove za implementaciju ETS Direktive postavljene su u Zakonu o zaštiti zraka (61). ETS Direktiva prenesena je u obliku Uredbe o emisijskim kvotama stakleničkih plinova i načinu trgovanja emisijskim jedinicama (62). U drugoj fazi operatori 73 postrojenja koja su obveznici sustava trgovanja emisijskim jedinicama stakleničkih plinova podnijeli su zahtjeve za besplatnu dodjelu emisijskih jedinica

postrojenjima sukladno Pravilniku o načinu besplatne dodjele emisijskih jedinica postrojenjima (63). Za razdoblje 2013.-2020. na nivou EU određena je kvota za sva postrojenja uključena u sustav trgovanja koja je za 21 % manja od količine verificiranih emisija koja su ta postrojenja imala 2005. godine. Pri tome jedna emisijska jedinica predstavlja pravo na emisiju jedne tone CO<sub>2</sub>e odnosno CO<sub>2</sub>eq.

U ETS-u osim operatora postrojenja, sudjeluju i operatori zrakoplova. Obveze u sektoru zrakoplovstva odnose se na praćenje i izvješćivanje emisija CO<sub>2</sub> i tonskih kilometara iz zrakoplova. Uspostavljeni mehanizam EU ETS pokazao se djelotvornim u smanjenju emisija stakleničkih plinova. Međutim, samo prelazak gospodarstva EU na "čiste" obnovljive izvore energije omogućit će postizanje klimatskih ciljeva propisanih Europskim zelenim planom i zakonodavnim okvirom EU-a za klimu. Direktivom (EU) 2018/2001 o promicanju uporabe energije iz obnovljivih izvora iz 2021. godine postavljen je obvezujući cilj da udio obnovljivih izvora energije u energetsom miksu EU-a dosegne 32 % do 2030. godine (70, 71). Obnovljivi izvori energije definiraju se kao izvori energije koji se obnavljaju u cijelosti ili djelomično i sačuvani su u prirodi. Prema hrvatskom Zakonu o energiji, obnovljivi izvori energije uključuju hidropotencijalnu, aerotermalnu, geotermalnu i hidrotermalnu energiju, energiju mora i vjetra, energiju iz biomase, plina dobivenog iz deponija otpada i obradom otpadnih voda, te solarnu energiju.

Podaci Eurostata za 2021. godinu pokazuju da je udio energije dobivene iz obnovljivih izvora u Hrvatskoj iznosio 31,3 %. Međutim, većina zemalja EU, posebno ekonomski snažne zemlje poput Njemačke, Francuske i Italije, još uvijek su daleko od postizanja cilja, budući da bi trebalo proći još 17 godina ulaganja u obnovljive izvore energije da bi se postiglo stanje kao u 2021. godini. Stoga, kako bi se postigli ciljevi postavljeni Europskim zelenim planom i paketom "Spremni za 55", predložena je revizija Direktive (EU) 2018/2001 o promicanju uporabe energije iz obnovljivih izvora. Privremeni dogovor o obvezujućem cilju za udio obnovljivih izvora energije do 2030. godine postignut je 30. ožujka 2023. godine, predviđajući minimalni udio od 42,5 %, s težnjom prema 45 %. Da bi se ostvarili predviđeni ciljevi, države članice EU dužne su povećati svoje doprinose utvrđene u Integriranim nacionalnim energetske i klimatskim planovima (NECPs). Ti planovi trebaju biti ažurirani tijekom 2023. i 2024. godine sukladno prijedlozima iz paketa. Posebno je važno istaknuti Direktivu (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 (72). Ovaj dokument uspostavlja zajednički okvir za promicanje energije iz obnovljivih izvora. Njime se postavlja obvezujući cilj Unije za ukupni udio energije iz obnovljivih izvora u bruto konačnoj potrošnji energije Unije 2030. Njime se također utvrđuju pravila o financijskoj potpori za električnu energiju iz obnovljivih izvora, o vlastitoj potrošnji te električne energije, o korištenju energije iz obnovljivih izvora u sektoru grijanja i hlađenja te u sektoru prometa, o regionalnoj suradnji između država članica, te između država članica i trećih zemalja, o jamstvima podrijetla, o administrativnim postupcima i informatizaciji sustava.

Važnost ove direktive je da u kontekst sadašnjeg vremena i globalnih događanja stavlja naglasak na važnost povećanja energetske učinkovitosti i potpunog iskorištenja svakog tehnološkog procesa, uz što veću uštedu energije, a za što će u nastavku rada biti prikazano na istraživanom materijalu SPK primjenom LCA metodologije.

Nova direktiva doslovno navodi:

„(1) U kontekstu europskog zelenog plana utvrđenog u Komunikaciji Komisije od 11. prosinca 2019. („Europski zeleni plan”) Uredbom (EU) 2021/1119 Europskog parlamenta i Vijeća (4) utvrđeni su cilj klimatske neutralnosti Unije do 2050. i cilj smanjenja neto emisija stakleničkih plinova do 2030. za najmanje 55 % u odnosu na razine iz 1990. Unijin cilj klimatske neutralnosti iziskuje pravednu energetska tranziciju kojom se ne zapostavlja niti jedno područje i niti jedan građanin, povećanje energetske učinkovitost i znatno veći udio energije iz obnovljivih izvora u integriranom energetska sustavu.

(2) Energija iz obnovljivih izvora ima ključnu ulogu u postizanju tih ciljeva s obzirom na to da energetska sektor danas stvara više od 75 % ukupnih emisija stakleničkih plinova u Uniji. Smanjenjem tih emisija stakleničkih plinova energija iz obnovljivih izvora može također doprinositi svladavanju izazova povezanih s okolišem, kao što je gubitak bioraznolikosti, te smanjenju onečišćenja u skladu s ciljevima Komunikacije Komisije od 12. svibnja 2021. naslovljene „Put prema zdravom planetu za sve Akcijski plan EU-a: „Prema postizanju nulte stope onečišćenja zraka, vode i tla”. Zelena tranzicija na gospodarstvo koje se temelji na energiji iz obnovljivih izvora doprinijet će postizanju ciljeva Odluke (EU) 2022/591 Europskog parlamenta i Vijeća (5) kojom se također nastoji zaštititi, obnoviti i unaprijediti stanje okoliša, među ostalim zaustavljanjem i preokretanjem trenda gubitka bioraznolikosti. Zbog manje izloženosti energije iz obnovljivih izvora cjenovnim šokovima u odnosu na fosilna goriva, energija iz obnovljivih izvora može imati ključnu ulogu u suzbijanju energetska siromaštva.“

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 (72). Kako je navedeno, EU radi na aktivnom smanjenju emisija stakleničkih plinova koji su povezani s klimatskim promjenama. Najpoznatiji od njih je ugljični dioksid (CO<sub>2</sub>), ali oni drugi, prisutni u manjoj količini u atmosferi, mogu imati veći učinak kod zagrijavanja. Staklenički plinovi djeluju slično kao staklo u staklenicima, zadržavaju sunčevu toplinu i onemogućavaju da se vrati u svemir, čime se stvara efekt staklenika koji održava temperaturu Zemlje većom nego što bi ona inače bila. Globalni potencijal zatopljenja (GWP) je mjera koja se rabi za usporedbu učinaka različitih stakleničkih plinova na globalno zatopljenje, pri čemu se u obzir uzima njihov učinak tijekom određenog vremenskog razdoblja, obično 100 godina. Za razdoblje od 100 godina GWP za CO<sub>2</sub> (ugljični dioksid) je 1. Ovo je osnovna jedinica s kojom se uspoređuju svi drugi plinovi. GWP za CH<sub>4</sub> (metan) je 25. To znači da 1 tona metana ima isti učinak na globalno zatopljenje kao 25 tona CO<sub>2</sub> tijekom razdoblja od 100 godina. Ove vrijednosti su prihvaćene međunarodno i koriste se u procjenama i izvještajima kao što su oni Međuvladinog panela o klimatskim promjenama (IPCC). Nakon pretvaranja svih emisija u ekvivalentne količine CO<sub>2</sub>, vrijednosti se sumiraju da bi se dobio ukupni potencijal globalnog zatopljenja (u ovom istraživanju prilikom obrade SPK).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

SPK je nusproizvod klasičnog procesa prerade kave i predstavlja potencijalan alternativni izvor nutritivno važnih spojeva s mogućnošću primjene u razvoju funkcionalnih proizvoda. Među najvažnije bioaktivne sastavnice SPK ubrajaju se spojevi prirodno prisutni u SPK kao što su proteini, peptidi, polifenoli i prehrambena vlakna, ali i spojevi koji nastaju naknadno, tijekom procesuiranja kave. U takve spojeve ubrajamo primjerice melanoidine koji pokazuju širok spektar bioloških učinaka, a nastaju kao produkt Maillardove reakcije tijekom procesa prženja sirove kave. Valja istaknuti da SPK ima i dokazana prebiotička svojstva što ju čini funkcionalnom sirovinom visokog potencijala primjene (47).

Na kemijski sastav SPK značajno utječu sortiment, porijeklo sirovine (kave), način prerade i skladištenje. Kemijski sastav SPK dostupne u Hrvatskoj do danas nije istražen. 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 visoko-účinkovitih postupaka koji će omogućiti održivu i isplativu ekstrakciju biološki vrijednih sastavnica (73, 74).

Dva učinkovita postupka za ekstrakciju biološki važnih sastavnica iz različitih vrsta biomase, a koja pokazuju niz prednosti u odnosu na klasičnu ekstrakciju otapalom, su ultrazvučna ekstrakcija i mikrovalna ekstrakcija. Upotreba netoplinske ultrazvučne ekstrakcije rezultira značajnim poboljšanjem prinosa u usporedbi s konvencionalnim tehnikama te obično zahtjeva korištenje manjih količina otapala i značajno kraće trajanje ekstrakcije. Veći prinosi, u odnosu na konvencionalne metode, često se postižu i primjenom toplinske ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Mikrovalovi imaju ograničen energetski potencijal pa ne uzrokuju promjene u strukturi tvari, međutim uzrokuju titranja molekula i porast trenja unutar strukture tvari što uzrokuje porast temperature ekstrakcijske smjese i može rezultirati povećanjem prinosa za pojedine kategorije bioaktivnih spojeva. Za dodatnu optimizaciju, u smislu povećavanja stupnja iskorištenja ekstrakcijskog procesa, u posljednje se vrijeme često koriste i kombinacije više inovativnih ekstrakcijskih tehnika, primjerice ultrazvuka u kombinaciji s mehano-kemijskom- ili mikrovalnom ekstrakcijom (75).

Nekoliko recentnih istraživanja usmjereno je na primjenu inovativnih ekstrakcijskih tehnika u dobivanju biološki vrijednih sastavnica iz SPK. Utvrđeno je da se ultrazvučna ekstrakcija može uspješno primijeniti za ekstrakciju polifenola, dok i ultrazvučna i mikrovalna ekstrakcija rezultiraju poboljšanim prinosima proteina u odnosu na konvencionalne metode (pri čemu se u jednom istraživanju mikrovalna ekstrakcija

pokazala tehnikom izbora za ekstrakciju proteina zbog najkraćeg vremena ekstrakcije i najvećih prinosa) (76, 77).

Bez obzira što je primjena UAE i MAE u ekstrakciji funkcionalnih sastavnica SPK već istraživana, ove su tehnike odabrane kao fokus-tehnike kod ovog istraživanja zbog njihove visoke razine tehnološke spremnosti, odnosno relativno jednostavnog *scale-up*-a i eventualne buduće primjene.

U okviru ovog istraživanja po prvi puta će se pratiti utjecaj navedenih ekstrakcijskih tehnika na kvalitetu dobivenih proteinskih ekstrakata i to u smislu aminokiselinskog sastava te strukturalnih karakteristika proteina s posebnim naglaskom na mogućnost dobivanja bioaktivnih peptida. Također, po prvi puta će se primjenom LCA metodologije analizirati životni ciklus proteinskih ekstrakata dobivenih različitim ekstrakcijskim postupcima te će se usporediti njihovi ugljični otisci, a sve u skladu s ISO normom (78). Oba čimbenika (kvaliteta dobivenih ekstrakata i ugljični otisak ekstrakcijskih procesa) razmatrat će se, uz prinos proteina, u odabiru optimalnog ekstrakcijskog postupka. Naime, iako se inovativne ekstrakcijske tehnike općenito smatra zelenima i ekološki prihvatljivima, njihov pravi ekološki otisak nije poznat.

Rezultati ovog istraživanja doprinjet će trenutnim ograničenim saznanjima o mogućnostima korištenja MAE i UAE u ekstrakciji proteina iz SPK i po prvi puta pokazati utjecaj tih tehnika na kvalitetu dobivenih proteinskih ekstrakata, osobito s obzirom na mogućnost dobivanja biološki aktivnih peptida; ukazati na mogućnost koekstrakcije polifenola u svrhu dobivanja proteinskih ekstrakata poboljšane funkcionalnosti te omogućiti usporedbu ugljičnog otiska (GWP) optimirane MAE i UAE metode.

Procjenom životnog ciklusa optimiranih ekstrakcijskih postupaka na laboratorijskoj razini, moguće je procijeniti i opterećenje okoliša koje će nastati kao posljedica provedbe istih na industrijskoj razini što predstavlja značajan širi doprinos u području. Rezultati ovog rada doprinjet će većim mogućnostima iskorištavanja SPK te ukazati na važnost parametara kvalitete i održivosti (ekološkog otiska) u razvoju modernih tehnika procesuiranja (79, 80), a kako bi se poboljšala kvaliteta konačnog proizvoda, uz istovremenu minimalizaciju negativnih učinaka na okoliš.

### **3. MATERIJALI I METODE**

## 3.1 Materijali

### 3.1.1 Uzorci

Za provedbu istraživanja uzorci SPK dobiveni su od tvrtke Franck d. d., proizvođača kave, čaja i snack proizvoda (Zagreb, Hrvatska). Uzorci su dobiveni u obliku briketa te sadrže mješavinu dvije vrste kave koje se najčešće i pojavljuju: *C. arabica* i *C. robusta*. Briketi su nusproizvodi iz pržionika kave te su radi lakše analize usitnjeni u prah pomoću kuhinjskog štapnog miksera. Temeljeno na pregledu literature i ranijim istraživanjima (46) za provedbu istraživanja pripremljene su suspenzije koje sadrže 10 g SPK i deioniziranu vodu u omjeru 1:50 (w/v).

### 3.1.2 Kemikalije i standardi

Kemikalije:

1. AccQ•Fluor Ultra Eluent A Concentrate (Waters, Milford, SAD)
2. Aceton (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
3. Acetonitrile (ACN) (VWR Chemicals, Radnor, SAD)
4. Amonij formijat (GramMol, 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 (Citrate-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. Trifluorocetna kiselina (TFA) (Merck, Burlington, SAD)
25. Triklorocetna 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.  $\alpha$ -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 (CPAChem, Bogomilovo, Bugarska)
3. Gel filtration standards (BioRad, Hercules, 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 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 0,1 M NaOH
5. Reagens B: 0,5 %  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  u 1 % K, Na- 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 odmjerne 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<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 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  $\mu$ m df (Restek, Bellefonte, SAD)
8. Kolona za LC-MS ACQUITY UPLC BEH 150 x 2,1mm; 1,7 $\mu$ m (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, USA)
6. Program za analizu podataka: SimaPro (PRé Sustainability, LE Amersfoort, Nizozemska)

### 3.2 Plan istraživanja i metodologija

U prvom dijelu istraživanja provela se analiza zdravstvene ispravnosti sirovine. Određivanje zdravstvene ispravnosti SPK se radilo 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 (engl. *Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*) metodologije (81), 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) (82).

U drugom koraku, proveden je dizajn eksperimenta za predviđeno istraživanje kako bi se provela optimizacija ekstrakcije proteina i istražila važnost utjecaja ekstrakcijskih parametara pogodnih za proteine na prinose polifenola, i to korištenjem dvije ekstrakcijske tehnike (mikrovalne i ultrazvučne) (38, 40, 83). Dizajn eksperimenta je napravljen u programu STATGRAPHICS Centurion (84). To je statistički softverski paket koji omogućuje analizu podataka pomoću različitih statističkih metoda. Ovaj softver nudi širok raspon alata za statističku analizu, vizualizaciju podataka, regresijsku analizu, kontrolu kvalitete i dizajn eksperimenata. Koristi se za provođenje statističkih analiza i vizualizaciju rezultata u jednostavnom i korisnički pristupačnom sučelju i pri tome omogućuje korisnicima provođenje raznih statističkih metoda, uključujući ANOVA, regresijsku analizu, multivarijantne analize i druge. Softver omogućuje vizualizaciju podataka putem različitih vrsta grafova i dijagrama, što pomaže u tumačenju rezultata. Dizajniran je da bude korisnički prijateljski pa je prikladan i za korisnike bez opsežnog statističkog znanja. Eksperiment za mikrovalnu ekstrakciju dizajniran je i organiziran u faktorijalnom dizajnu, gdje su nezavisne varijable snaga mikrovalova i vrijeme tretiranja. Snaga je varirana u vrijednostima 100, 150 i 200 W, a vrijeme 3, 6 i 9 minuta te je putem software-a planirano, 9 tretiranja uzoraka tj. ekstrakata. Svaka ekstrakcija je provedena u duplikatu. Eksperimentalni dizajn za ultrazvučnu ekstrakciju je također kao kod mikrovalne ekstrakcije napravljen u programu STATGRAPHICS Centurion. Ulazni parametri bili su vrijeme (3, 6 i 9 min) i amplituda (50, 75 i 100 %), uz uvjet da temperatura nije smjela prijeći 40 °C (da se spriječi denaturacija proteina), čime je planirano tretirati 9 uzoraka (ekstrakata). Izlazni parametri bili su prinos ukupnih proteina i polifenola. Svaka ekstrakcija je provedena u duplikatu.

Kao otapalo izbora koristila se voda, a u okviru provedbe preliminarnih istraživanja određivao se optimalni maseni omjer uzorak/otapalo za obje ekstrakcijske tehnike. Optimizacija provedbe ultrazvučne ekstrakcije uključuje variranje trajanja ekstrakcije, debljine sonde i temperature (uz ograničenje maksimalne temperature na 40 °C kako bi se spriječila denaturacija proteina), a optimizacija provedbe mikrovalne ekstrakcije uključuje variranje vremena ekstrakcije i snage. U prvoj fazi primijenjen je 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 i aminokiselina uz primjenu metode odzivne površine. Udio proteina određivao se metodom po Lowryju (85). Kvantitativna analiza aminokiselina u dobivenim ekstraktima nakon optimizirane ekstrakcije je provedena koristeći metodu Waters AccQ•Tag, a obuhvaća hidrolizu, derivatizaciju aminokiselina s AccQ•Fluor derivatizacijskim reagensom te tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (86).

Ekstrakti SPK dobiveni optimiziranim postupkom ultrazvučne i mikrovalne ekstrakcije su dodatno karakterizirani s obzirom na udio ostalih funkcionalnih komponenti: ukupnih fenola, ukupnih antioksidansa te proteina i peptida. Ukupni fenoli i antioksidansi su određeni standardnim spektrofotometrijskim metodama (87). Separacija i karakterizacija peptida provela se postupkom gel filtracijske kromatografije (88). Pomoću ultrazvučne i mikrovalne ekstrakcije ekstrahirali su se proteini i polifenoli te je svrha bila da se na kraju odrede i karakteriziraju proteini/peptidi/aminokiseline u tako dobivenim ekstraktima. Tijekom razvoja ekstrakcijskih postupaka metodom procjene životnih ciklusa odredili su se i njihovi pripadajući ekološki otisci kroz identifikaciju količina potrebne energije i materijala te otpada koji se ispušta u okoliš u odnosu s onima konvencionalnog procesa. Simulirale su se očekivane situacije za prikupljanje, analizu i praćenje podataka o održivosti procesa i proizvoda. Za provedbu analize životnih ciklusa koristio se programski paket SimaPro (89). Plan provedenog istraživanja prikazan je na **Slici 13**.



## SREBRNA POKOŽICA KAVE

### 1. ODREĐIVANJE ZDRAVSTVENE ISPRAVNOSTI

#### OSTACI PESTICIDA

GC-MS/MS; LC-MS/MS

#### TEŠKI METALI

Mikrovalna digestija uzoraka; ICP-MS

### 2. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE PROTEINA

Eksperimentalni dizajn

#### MAE

$\bar{t}$ =3-9 min, 150-300W (n=9)

- udio proteina (po Lowry-ju)
- utjecaj vremena; amplitude/snage mikrovalova i kombinacija

#### UAE

$\bar{t}$ =3-9 min, amplituda 50-100% (n=9)

Ukupni fenoli (Folin Ciocalteu)

### 3. ANALIZA KVALITETE I UGLJIČNOG OTISKA PROTEINSKIH EKSTRAKATA

#### OPTIMALNI UVJETI MAE

#### OPTIMALNI UVJETI UAE

- Analiza aminokiselinskog sastava proteinskih ekstrakata s najvećim prinosom za UAE i MAE (HPLC)
- Separacija proteinskih frakcija i određivanje veličine proteina (SEC-HPLC i SDS-PAGE; MALDI-TOF/TOF)
  - Identifikacija strukture proteinskih frakcija (UniProt)

Laboratorijski podaci i podaci iz industrije

- Određivanje utroška energije za optimalni UAE i MAE
- Analiza životnih ciklusa laboratorijskog procesa za optimalni UAE i MAE – izračun potencijala globalnog zagrijavanja (GWP)
- Scale-up na industrijsku razinu u dva scenarija upravljanja ostatnim materijalom

Slika 13. Plan provedenog istraživanja

### 3.2.1 Određivanje zdravstvene ispravnosti SPK

#### 3.2.1.1 Određivanje ostataka pesticida

Uzorci za određivanje ostataka pesticida pripremljeni su metodom QuEChERS (*engl. Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*) prema Anastassiades i sur. (81). Nakon toga su kvantificirani pomoću plinske i tekućinske kromatografije povezane s dvostrukom masenom spektrometrijom.

U kivetu od 50 ml odvaži se  $2,0 \pm 0,03$  g usitnjeni i homogenizirani uzorak SPK te se doda 10 g vode. Pesticidi se iz uzorka ekstrahiraju dodatkom 10 ml acetonitrila, ekstrakcija kruto-tekuće. Zatim se dodaje komercijalno dostupna mješavina soli magnezij-sulfata i natrij-klorida i citratnih soli koje omogućavaju razdvajanje acetonitrilnog od vodenog sloja. Smjesa se snažno izmućka te centrifugira 5 min na  $>3000$  okretaja/min. Za određivanje ostataka pesticida u uzorku SPK korištene su LC-MS/MS i GC-MS/MS kako bi se identificirao što veći broj pesticida. Glavni razlog jest što navedene tehnologije nisu jednako osjetljive na sve pesticide. Za analizu na LC-MS/MS potrebno je uzeti 100  $\mu$ l sirovog acetonitrilnog ekstrakta te razrijediti s 900  $\mu$ l vode. Tako pripremljen ekstrakt snima se na LC-MS/MS-u. Uzorci za analizu na GC-MS/MS-u moraju proći dodatan korak. Nakon centrifuge iz gornjeg organskog (acetonitrilnog) sloja uzima se alikvot od 6 ml te se odvaja 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 ulijeva u bočicu od 1,5 ml, tamnog stakla zbog mogućeg postojanja fotosenzibilnih pesticida. Takav uzorak spreman je za analizu na GC-MS/MS-u.

Za provedbu analize nužno je pripremiti uzorke u koje je nacijepljena točno poznata koncentracija standarda (tzv. spajkani uzorci) kako bi se umanjio utjecaj matriksa na rezultate. Za analizu na GC-MS/MS koncentracija standarda iznosila je 0,002  $\mu$ 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 spajkanih uzoraka.

Pripremljeni uzorci injektirani su i analizirani primjenom GC-MS/MS i LC-MS/MS kako

bi se odredio što veći broj pesticida. Uzorci koji su analizirani plinskom kromatografijom (GC MS-TQ8050 NX) (**Slika 14 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 14 b**) snimani su u programu MassLynx (**90**), a podaci su obrađeni u programu TargetLynxXS (**91**).



a)

b)

**Slika 14.** Instrument GC-MS/MS (a) i LC-MS/MS (b) korišteni za određivanje ostataka pesticida (vlastite fotografije)

Kromatografski uvjeti pod kojim su obavljena mjerenja plinskom i tekućinskom kromatografijom prikazani su u **Tablici 2**. Dobiveni kromatogrami analizirani su na temelju vremena zadržavanja komponenti u uzorku i standardu te su kvalitativno identificirani pojedini pesticidi u uzorcima. 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

	<i>GC-MS/MS</i>	<i>LC-MS/MS</i>
<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 $\mu$ m df, Restek	ACQUITY UPLC BEH 150 x 2,1mm; 1,7 $\mu$ 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 $\mu$ l	30 $\mu$ l
<i>Vrijeme analize</i>	40,25 min	20 min

Uspoređivanjem odgovora dobivenog iz standardne otopine i odgovora iz uzorka SPK je ustanovljeno da SPK kao nepročišćeni i sirovi nusproizvod predstavlja uzorak složene matrice koja može utjecati na rezultate tako da suzbija ili pojačava odgovor analita zbog koeluiranja sastojaka matrice. S ciljem smanjenja utjecaja matrice provodi se pročišćavanje uzorka mješavinom soli koji se može ponoviti nekoliko puta, no nije poželjno jer dolazi do gubitka spojeva unutar uzorka. Iz tog razloga proveden je tzv. *matrix matching* (podudaranje matrice) kojim se nastojalo maksimalno smanjiti utjecaj matrice.

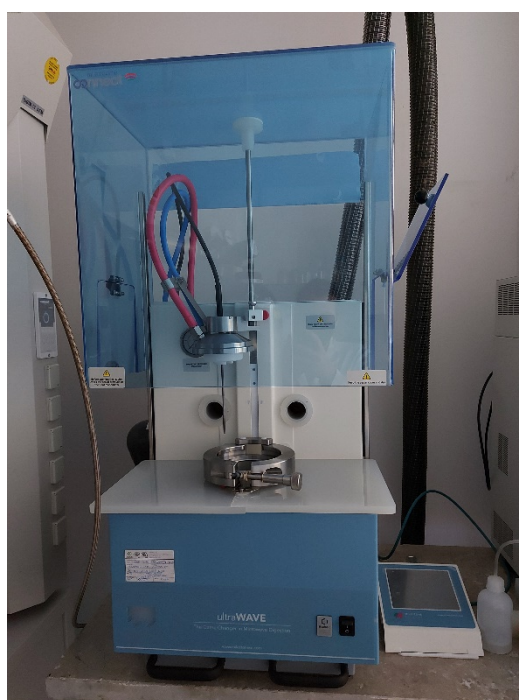
### 3.2.1.2 Određivanje teških metala

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 15**). 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 15.** Jedinica za mikrovalnu digestiju korišten za razgradnju uzorka (vlastita fotografija)

Za analizu elemenata korištena je induktivno spregnuta plazma s masenim detektorom (ICP-MS 7900) (**Slika 16a**) i automatskim uzorkivačem (**Slika 16b**), prema uvjetima 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  $\mu\text{g/L}$ .

**Tablica 3.** Kromatografski uvjeti ICP-MS-a

<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 16.** Instrument ICP-MS korišten za određivanje teških metala (a) te njegov dio za automatsko uzorkovanje (b) (vlastite fotografije)

### 3.2.2 Optimizacija ekstrakcije proteina i polifenola iz SPK 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 17**).



**Slika 17.** Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju (vlastite fotografije)

Cilj provođenja ove mikrovalne ekstrakcije je smanjenje vremena ekstrakcije uz istovremeno smanjenje upotrebe otapala za ekstrakciju. Zbog termolabilnosti proteina ovo je najpogodnija metoda jer se ekstrakcija može provoditi pri nižim temperaturama, uz ostale prednosti poput bržeg zagrijavanja, nižeg gradijenta temperature i konačno većeg prinosa ekstrakcije promatranih analita ukupnih proteina i polifenola. Dizajn eksperimenta je napravljen u programu STATGRAPHICS Centurion (**84**). Eksperiment je organiziran u faktorijalnom dizajnu, gdje su nezavisne varijable snaga i vrijeme tretiranja. Ulazni parametri eksperimenta su snaga i vrijeme tretiranja, a izlazni parametri su prinos ukupnih proteina i polifenola. Snaga je varirana u vrijednostima 100, 150 i 200 W, a vrijeme 3, 6 i 9 minuta te je dobiveno 9 uzoraka ekstrakata (**Tablica 4**). Svaka ekstrakcija je provedena u duplikatu. 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  $10,0000 \pm 0,0001$  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 filtrira, a dobiveni filtrati se koriste za daljnje analize.

### 3.2.3 Optimizacija ekstrakcije proteina i polifenola iz SPK postupkom ultrazvučne ekstrakcije

Ultrazvučna ekstrakcija polifenola i proteina iz SPK provedena s uređajem Ultrasonic processor Q700, SAD (**Slika 18**) korištenjem deionizirane vode kao ekstrakcijskog sredstva. Cilj optimizacije ultrazvučne ekstrakcije je povećati prinos željenih komponenti (ukupnih proteina i polifenola), a smanjiti vrijeme ekstrakcije, reducirati korištenje otapala,

reducirati nastanak slobodnih radikala i pri tome očuvati prirodna svojstva materijala.



**Slika 18. Uređaj za ultrazvučnu ekstrakciju Q700 (vlastita fotografija)**

Eksperimentalni dizajn je također kao kod mikrovalne ekstrakcije napravljen u softveru STATGRAPHICS Centurion. Ulazni parametri bili su vrijeme (3, 6 i 9 min) i amplituda (50, 75 i 100 %) uz uvjet da temperatura nije smjela prijeći 40 °C (da se spriječi denaturacija proteina), čime je dobiveno 9 ekstrakata (**Tablica 5**). Izlazni parametri bili su prinos ukupnih proteina i polifenola. Svaka ekstrakcija je provedena u duplikatu.

**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 odvaži se  $10 \pm 0,0001$  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. Zatvorese 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 ( $J K^{-1} g^{-1}$ );

$dT$ - promjena temperature u točki T1 i T2 (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 ( $J K^{-1} g^{-1}$ );

$x_n$ - udio određenog sastojka;

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

### 3.2.4 Određivanje sadržaja i karakterizacija proteina

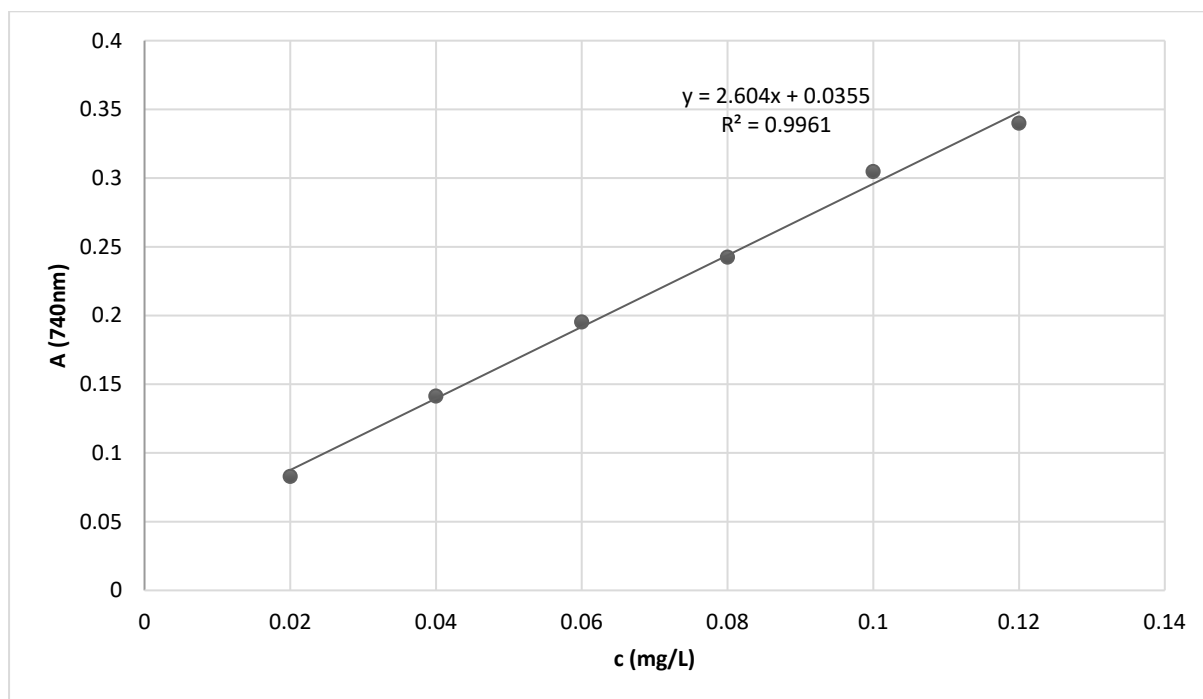
#### 3.2.4.1 Određivanje ukupnih proteina metodom po Lowryju

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 reagen sa 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 (92).

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 19**).



**Slika 19.** 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) (86), a obuhvaća hidrolizu, derivatizaciju aminokiselina s AccQ•Fluor derivatizacijskim reagensom AccQ•Fluor Reagent te HPLC kvantitativnu analizu. Za hidrolizu proteina 5  $\mu$ L svakog ekstrakta upareno je do suha u vakuum koncentratoru. Talog je otopljen u 200  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ m. Standardna otopina aminokiselina koncentracije 2,5 mM je razrijeđena do koncentracije od 100 pmol/ $\mu$ L. Separacija derivatiziranih aminokiselina je provedena prema metodi opisanoj u **Tablici 6**.

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

<b>Uvjeti kromatografske separacije i eluacije</b>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Vrijeme (min)</th> <th>% Mobilna faza A</th> <th>% Mobilna faza B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">0,0</td> <td style="text-align: center;">98,0</td> <td style="text-align: center;">2,0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">0,5</td> <td style="text-align: center;">98,0</td> <td style="text-align: center;">2,0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">15,0</td> <td style="text-align: center;">93,0</td> <td style="text-align: center;">7,0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">19,0</td> <td style="text-align: center;">90,0</td> <td style="text-align: center;">10,0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">28,0</td> <td style="text-align: center;">74,0</td> <td style="text-align: center;">26,0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">35,0</td> <td style="text-align: center;">67,0</td> <td style="text-align: center;">33,0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">36,0</td> <td style="text-align: center;">67,0</td> <td style="text-align: center;">33,0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">37,0</td> <td style="text-align: center;">0,0</td> <td style="text-align: center;">100,0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">45,0</td> <td style="text-align: center;">0,0</td> <td style="text-align: center;">100,0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">46,0</td> <td style="text-align: center;">98,0</td> <td style="text-align: center;">2,0</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">52,0</td> <td style="text-align: center;">90,0</td> <td style="text-align: center;">2,0</td> </tr> </tbody> </table>	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
	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																																					
Gradijentna elucija:																																					

<b>Standard</b>	Smjesa derivatiziranih aminokiselina (amino acid standard H mixture, Waters) u koncentraciji 100 pmol/ $\mu$ L
-----------------	--

### 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 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. (93).

Nakon razdvajanja proteina SDS-PAGE metodom i njihove digestije u gelu, provedena je analiza dobivenih peptida MALDI-TOF/TOF metodom. Analiza peptida provedena je uz pomoć MALDI-TOF/TOF (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  $\mu$ L dodano je 15  $\mu$ L 10 % vodene otopine natrijevog deoksikolata te 225  $\mu$ 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  $\mu$ 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 pripravljena 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 pripravljena je otapanjem 0,125 g boje Coomassie brilliant blue G250 u 100 mL deion izirane vode. U tako pripravljenu otopinu dodano je 125 mL metanola i 25 mL octene kiseline. U odmjerne tikvici od 100 ml pripravljena 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

<b>Uvjeti kromatografske separacije i elucije</b>	Kolona:	3 $\mu$ m, 4,6 x 300 mm, BioSec-3, Agilent	
	Volumen injekt. uzorka:	10 $\mu$ L	
	Volumen injekt. standarda:	5 $\mu$ L	
	Detekcija:	215	
	Protok mobilne faze:	0,3 mL/min	
	Mobilna faza:	145 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0	
	Temperatura kolone:	20 °C	
	Elucija:	Izokratna	
<b>Standard</b>	Smjesa proteina poznate molekulske mase korištena za određivanje molekulske mase uzoraka:		
	<b>Protein</b>	<b>Molekulska masa (kDa)</b>	<b>RT (min)</b>
	tireoglobulin	670	6,890
	$\gamma$ -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 (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight*) spektrometra masa (engl. *mass spectrometry*, MS) Autoflex Speed (Bruker, Njemačka) s parametrima - Parametri MS/MS analize peptida spektrometrom masa (94). 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) (95).

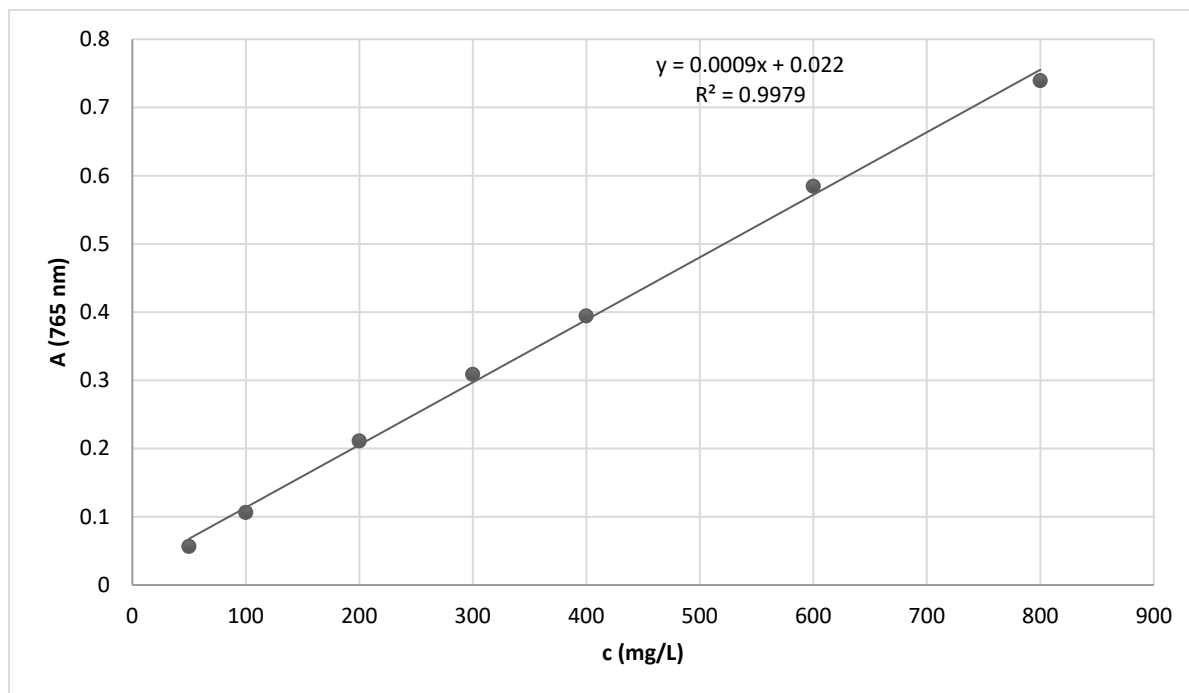
### 3.2.5 Određivanje ukupnih polifenola

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 (96). Intenzitet plavog obojenja je upravo 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 se i doda joj se 1,5 mL 20 %-tne otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. 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 poznate koncentracije 1000 mg/L razrjeđuje se 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

20).



**Slika 20.** Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije ( $A_{765}$ ) o koncentraciji galne kiseline

### 3.2.6 Određivanje potencijala globalnog zatopljenja (GWP) kod procesa dobivanja ekstrakata SPK

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 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) računa se prema izrazu [3]:

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

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 CO<sub>2</sub>/kWh, može se izračunati Emisija CO<sub>2</sub> (kg) pa je tako izraz globalnog zatopljenja [5]:

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

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

Za potpun izračun GWP potrebno je dodatno prikupiti podatke o emisijama stakleničkih plinova koji nastaju tijekom različitih faza životnog ciklusa SPK. Uz potrošnju energije, glavni parametri uključuju emisije CO<sub>2</sub> (ugljikov dioksid), energetska potrošnja, transport, količina otpada, određivanje potencijala za kompostiranje. Podaci se mogu dobiti iz baze podataka CCaLC2 (School of Chemical Engineering and Analytical Science (CEAS), Manchester, UK) ili Ecoinvent (Ecoinvent, Zurich, Švicarska).

Za potrebne izračune u ovom radu korištena je baza CCaLC2 (97). Baza se sastoji od oko 6000 podataka, uključujući podatke o materijalima, energiji, prijevozu, pakiranju i otpadu. GWP ekstrakata SPK izračunat je na temelju podataka potrošnje energije kod ekstrakcijskih postupaka te iz procesnih podataka prikupljenih od tvornice Franck d.d. i to prema nekoliko scenarija: odlaganje otpada (sastav otpada jedan je od glavnih čimbenika koji utječe na emisije iz odlaganja otpada, jer različite vrste otpada sadrže različite količine razgradivog organskog ugljika i fosilnog ugljika) i kompostiranje (aerobna fermentacija organske tvari u otpadu), oboje u cijelosti ili djelomično (98).

Nakon što je za svaki scenarij dobivena količina emisija određenog stakleničkog plina, te količine se pretvaraju u ekvivalentne količine CO<sub>2</sub> kako bi se dobili izračuni za GWP (79, 80).

## **4. REZULTATI**

+



#### 4.1 Zdravstvena ispravnost SPK

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 SPK

U **Prilogu 1** navedeno je ukupno 128 pesticida koji su se nakon optimizacije metode mogli uspješno kvantificirati pomoću primijenjene GC-MS/MS-om (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 analiziranih 265 pesticida, u uzorku SPK su detektirana samo 3 pesticida prikazana u **Tablici 8** i to flutriafol, imidakloprid i piperonil butoksid.

**Tablica 8.** Ostaci pesticida u uzorku SPK

	<b>Pesticid</b>	<b>Koncentracija (mg/kg)</b>
<b>1</b>	Flutriafol	0,012±0,002
<b>2</b>	Imidakloprid	0,016±0,002
<b>3</b>	Piperonil butoksid	0,002±0,000

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 nisu u skladu s nekim prethodnim istraživanjima koja su ustanovila da su pronađeni razni ostaci pesticida u zrnu kave koji mogu predstavljati rizik za potrošače (**99-102**).

Otkriveni pesticid flutriafol je kontaktni 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 (**103**). Imidakloprid pripada skupini neonicotinoidnih/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 (104). 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 ciljne molekule, što povećava smrtnost ciljnog organizma (105). Na kraju, kada se usporede rezultati istraživanja zrna kave i istraživanja SPK (106) 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 (107).

#### 4.1.2 Udio teških metala u SPK

Teški metali su skupina metala koja ima gustoću veću od  $5 \text{ g/cm}^3$ , stoga u tu skupinu spada velik broj metala uključujući i neke mikromineralne. Zbog svoje postojanosti, visoke otrovnosti i sklonosti da se akumuliraju u ekosustavu, teški su metali opasni za žive organizme (108). 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

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

\*MRO za dodatke prehrani; \*\*MRO za rižu

Daleko najveću koncentraciju ima nikal (2,495±0,055 mg/kg), dok su u puno manjim koncentracijama detektirani olovo (0,249±0,077 mg/kg), arsen (0,107±0,018 mg/kg) te kadmij (0,106±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 nije opasna za ljudski organizam i 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 (109). Još uvijek nije donesen zakon o maksimalnoj količini arsena u ostalim vrstama hrane zbog pretpostavke da su količine arsena u hrani vrlo male (44). 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 (111). Hackethal i sur. (108) 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 trenutno ne postoje MRO vrijednosti pa se ne može znati koja je točno maksimalno dozvoljena razina nikla u hrani. EFSA je 2015. sumirala rezultate raznih istraživanja (112, 113) 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), znu 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

ta) 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 (114). 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 (115-117).

## 4.2 Primjenjivost mikrovalne ekstrakcije u revalorizaciji SPK

### 4.2.1 Udio i kvaliteta proteina u MAE ekstraktima SPK

#### 4.2.1.1 Udio ukupnih proteina u MAE ekstraktima SPK

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

**Tablica 10.** Udio proteina u ekstraktima SPK dobivenim mikrovalnom ekstrakcijom pod različitim uvjetima.

Oznaka uzorka	Vrijeme tretiranja [min]	Snaga [W]	Ukupni proteini [mg/L uzorka]
M1	6	100	$0,5215 \pm 0,01$
M2	9	200	$0,7734 \pm 0,07$
M3	9	100	$0,5213 \pm 0,08$
M4	3	200	$0,5912 \pm 0,01$
M5	6	200	$0,6622 \pm 0,06$
M6	6	150	$0,5926 \pm 0,16$
M7	9	150	$0,6885 \pm 0,01$
M8	3	100	$0,5286 \pm 0,00$
M9	3	150	$0,5742 \pm 0,00$

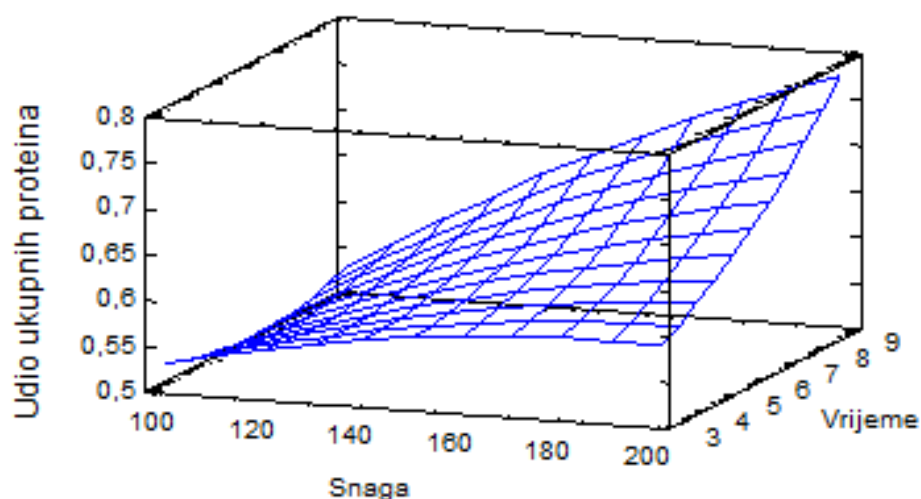
Vrijednosti koncentracije ukupnih proteina se kreću u rasponu od  $0,5213 \pm 0,08$  mg/L do  $0,7734 \pm 0,07$  mg/L. Najveću vrijednost koncentracije ukupnih proteina ( $0,7734 \pm 0,07$

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 ( $0,6885 \pm 0,01$  mg/L) je pokazao uzorak M7, koji je tretiran snagom od 150 W u trajanju od 9 minuta. Sličnu vrijednost  $0,6622 \pm 0,06$  mg/L imao je uzorak M5 tretiran 6 minuta, snagom 200 W. Ostali uzorci pokazali su nešto niže vrijednosti koncentracije ukupnih proteina, raspona od  $0,5213 \pm 0,08$  mg/L do  $0,5926 \pm 0,16$  mg/L. Sva tri uzorka (M1, M3 i M8) tretirana snagom mikrovalova od 100 W pokazala su gotovo jednake koncentracije proteina od  $0,5213 \pm 0,08$  mg/L do  $0,5286 \pm 0,00$  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 sa procjenom eksperimentalne pogreške. Iz **Tablice 11** vidi se da tri faktora i to snaga mikrovalova (A), vrijeme ekstrakcije (B) i faktor njihovog međudnosa (AB) imaju p-vrijednost  $< 0,05$  što znači da ta tri faktora imaju značajan učinak na promjenu udjela ukupnih proteina. To je važno jer pokazuje da prilikom optimiranja procesa i planiranja budućih pokusa u obzir moramo uzeti i snagu mikrovalova i vrijeme ekstrakcije, jer oba faktora značajno utječu na koncentraciju ukupnih proteina u ekstraktu. Vrijednost R-kvadrata iznosila 98,901 %, što znači da 98,901 % 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	0,000701876	1	0,000701876	3,21	0,1711
AB	0,00897756	1	0,00897756	41,05	0,0077
BB	0,000862509	1	0,000862509	3,94	0,1412
Ukupna pogreška	0,000656115	3	0,000218705	/	/
Ukupna pogreška (ispravljeno)	0,0597024	8	/	/	/

Na **Slici 21** 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 21.** 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 (polinom optimizacije) 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 su:

KUP-koncentracija ukupnih proteina;

A-snaga mikrovalova;

B-vrijeme ekstrakcije.

Predviđena promjena koncentracije ukupnih proteina s promjenom snage mikrovalova i vremena ekstrakcije vidljiva 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.

**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	0,604589
151,0	6,03872	0,606737
152,0	6,07869	0,608923
153,0	6,11992	0,611149
154,0	6,16241	0,613416
155,0	6,20617	0,615728
160,0	6,34231	0,621263
170,0	6,69235	0,648541

**Tablica 13** prikazuje rezultate optimizacije parametara ekstrakcije. Optimalna vrijednost koncentracije ukupnih proteina iznosi 0,778 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
<b>Optimalna vrijednost:</b>	0,778097 mg/L		

Vrijednost dobivena u optimalnim uvjetima:	0,7734 ± 0,07 mg/L
--	--------------------

#### 4.2.1.2 Aminokiselinski sastav MAE ekstrakta SPK

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 **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 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 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 jednim sličnim pronađenim istraživanjem (46).



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

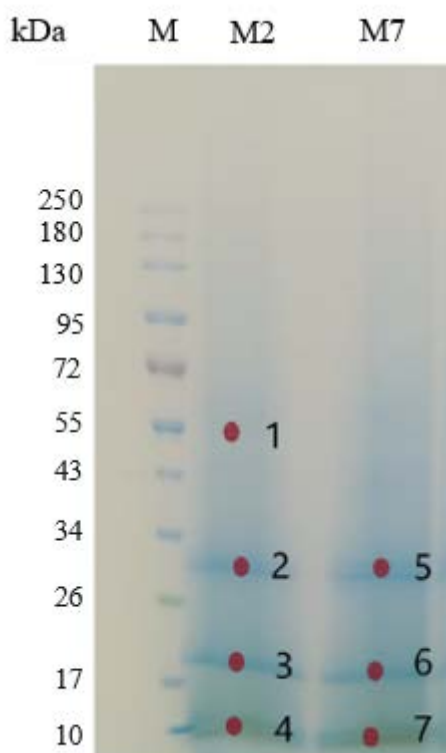
Aminokiselina	RT	M2 [ $\mu\text{mol/L}$ ]	M7 [ $\mu\text{mol/L}$ ]
Asx <sup>a</sup>	12,45	539,66	533,02
Ser	14,05	155,81	153,29
Glx <sup>a</sup>	14,75	403,39	440,91
Gly	16,15	404,64	394,97
His	16,69	36,65	36,94
Arg	20,42	113,05	111,93
Thr	21,17	93,89	96,76
Ala	22,47	212,70	209,15
Pro	24,63	485,60	488,52
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

<sup>a</sup> 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 SPK

Kako je prethodno opisano, razdvajanje proteina s obzirom na njihovu veličinu provedeno je standardnom laboratorijskom tehnikom SDS-PAGE. Uzorci su pripremljeni kako bi se osigurala optimalna reakcija sa SDS-om, odnosno zagrijavanjem uzorka u odgovarajućem puferu (koji sadrži SDS i merkaptoetanol) 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 da SDS-proteinski kompleksi imaju ujednačenu gustoću naboja i tijekom elektroforeze migriraju na osnovu molekularnih masa. Poznato je da je u takvim uvjetima grafički odnos  $\log_{10} M_r$  i  $R_f$  vrijednosti (udaljenost koju prijeđe protein prema udaljenosti koju prijeđe boja) strogo linearan. Stoga se za kalibraciju gel sustava koristi set

proteina poznatih molekularnih masa koji se razdvoji, a potom i vizualizira zajedno s analiziranim uzorcima. Za izradu kalibracijskog pravca izračunaju se Rf vrijednosti markera i na semilogaritamskoj skali ucrtaju u odnosu na molekularne mase. Nakon toga se Rf vrijednosti proteina u uzorcima koriste kako bi se iz kalibracijskog pravca očitala njihova molekularna masa. Tijekom pročišćavanja proteina, SDS-PAGE 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 22** 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 (**95**).



**Slika 22.** SDS-PAGE gel standardnog proteina (M) i uzoraka M2 i M7

Iz slike 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, a najniža. 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 (**118**).

**Tablica 15.** Lista identificiranih proteina/peptida u uzorcima

Linija na gelu	Pristupni broj*	M <sub>w</sub> [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	<b>Sadrži Barwin domenu</b>
5	A0A068V707	70,2	599,5	9	Nekarakteriziran protein
7	A0A068VGK6	15,7	144,2	4	<b>Sadrži Barwin domenu</b>

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

#### 4.2.2. Udio polifenola u MAE ekstraktima SPK

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	591,9± 0,10
M2	9	200	646,8 ± 0,06
M3	9	100	556,4 ± 0,04
M4	3	200	568,8 ± 0,02
M5	6	200	559,9 ± 0,15
M6	6	150	677,8 ± 0,03
M7	9	150	611,8 ± 0,11
M8	3	100	617,0 ± 0,09
M9	3	150	654,0 ± 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  $556,3969 \pm 0,04$  mg EGK/100 g do  $677,8111 \pm 0,03$  mg EGK/100 g. Najveći maseni udio polifenola ( $677,8111 \pm 0,03$  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  $646,7556 \pm 0,06$  mg EGK/100 g, što je tek treća po redu najveća dobivena vrijednost. Drugi najbolji rezultat pokazao je uzorak M9 ( $653,9917 \pm 0,06$  mg EGK/100 g), koji je tretiran 3 minute snagom mikrovalova od 150 W. Najniži maseni udio polifenola imao je uzorak M3 ( $556,3969 \pm 0,04$  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  $617,0333 \pm 0,09$  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 (**119, 120**)

**Tablica 17.** Analiza varijanci (ANOVA) za određivanje ukupnih fenola

Izvor	Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F-omjer	p-vrijednost
A: Snaga	17,2941	1	17,2941	0,01	0,9139
B: Vrijeme	103,614	1	103,614	0,08	0,7923
AA	6666,39	1	6666,39	5,33	0,1042
AB	4798,67	1	4798,67	3,83	0,1451
BB	1,02474	1	1,02474	0,00	0,9790
Ukupna pogreška	3754,72	3	1251,57	/	/
Ukupna pogreška (ispravljeno)	15341,7	8	/	/	/

### 4.3 Primjenjivost ultrazvučne ekstrakcije u revalorizaciji SPK

#### 4.3.1 Udio i kvaliteta proteina u UAE ekstraktima SPK

##### 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	0,8705 ± 0,06
U2	6	75	0,7368 ± 0,14
U3	9	100	0,8715 ± 0,09
U4	9	50	0,7062 ± 0,12
U5	9	75	0,6213 ± 0,05
U6	3	75	0,6110 ± 0,10
U7	6	50	0,5126 ± 0,12
U8	3	100	1,1012 ± 0,08
U9	3	50	0,6617 ± 0,10

Iz rezultata prikazanih u **Tablici 18** je vidljivo da je najveći maseni udio proteina određen u uzorku U8 ( $1,1012 \pm 0,08$  mg/L), a koji je tretiran ultrazvukom 3 minute i amplitudom 100 %. Nešto niže vrijednosti određene su u uzorcima U3 i U1 (redom  $0,8715 \pm 0,09$  mg/L i  $0,8705 \pm 0,06$  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 ( $0,5126 \pm 0,12$  mg/L) tretiranom 6 minuta, amplitudom 50 %.

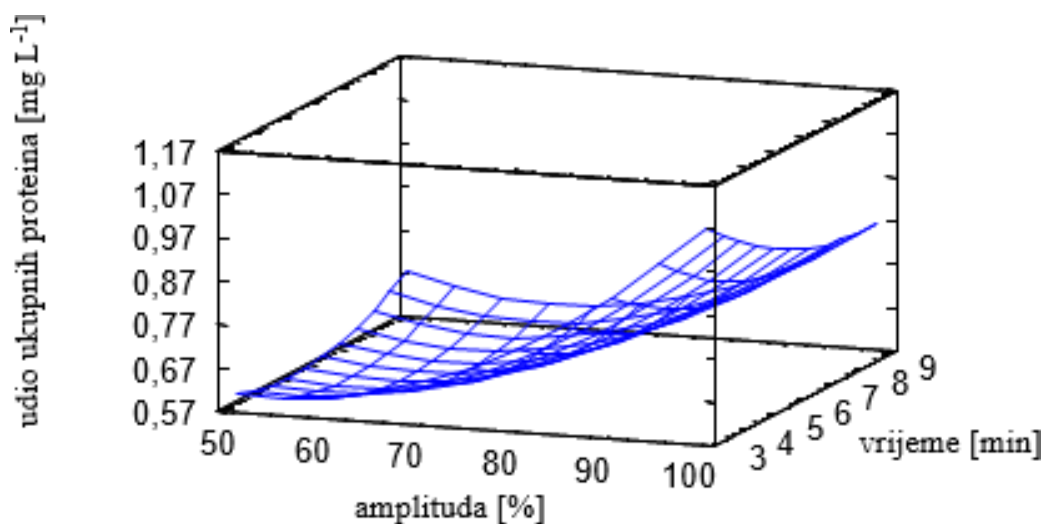
Iz rezultata dobivenih analizom varijance (**Tablica 19**) gdje se testira statistička značajnost svakog faktora usporedbom srednjeg kvadrata s procjenom eksperimentalne pogreške, utvrđeno je da značajan statistički učinak na udio ukupnih proteina ( $p < 0,05$ ) ima

amplituda. Stoga, prilikom optimizacije parametara UAE treba pažljivo prilagoditi postotak amplitude kao 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	0,00509834	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
Ukupna pogreška	0,0355909	3	0,0118636	-	-

Grafički prikaz 3D dijagrama (**Slika 24**) 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 24.** 3D prikaz odzivne površine za udio ukupnih proteina

Rezultati optimizacije provedene UAE iznose 3 minute za vremenski interval trajanja tretmana i amplitudu od 100 %. Stoga 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:

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

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 (0,8685 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
<b>Optimalna vrijednost:</b>	1,06394 mg/L		
<b>Vrijednost dobivena u optimalnim uvjetima</b>	0,8715 ± 0,09 mg/L		



#### 4.3.1.2 Aminokiselinski sastav UAE ekstrakata SPK

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 kiseline 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 (Phe, His, Ile, Leu, lys, Met, Tyr, Val). Ovdje nedostaje aminokiselina Thr koju nije bilo moguće izmjeriti ovom metodom jer dolazi do njene degradacije. Ta činjenica pokazuje veliki potencijal primjene SPK 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 ( $1,1012 \pm 0,08 \text{ mg/L}$ ) u odnosu na uzorak U6 ( $0,6110 \pm 0,10 \text{ mg/L}$ ). Dobiveni rezultati uglavnom su usporedivi s rezultatima Wen i suradnici (**46**) te Zangh i suradnici (**76**).

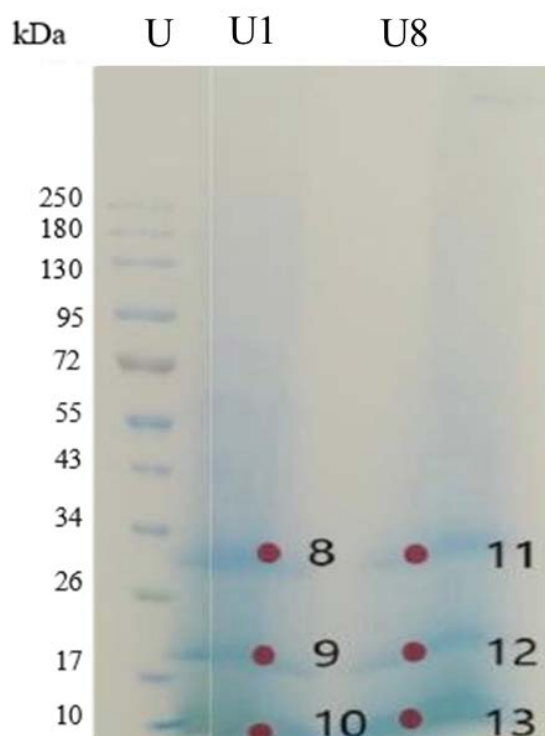
**Tablica 21.** Prikaz koncentracija pojedinih aminokiselina u uzorcima s najvećim prinosom proteina nakon UAE (U6 i U8)

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

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.

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

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

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

#### 4.3.2 Udio i kvaliteta polifenola u ekstraktima SPK

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  $375,5722 \pm 0,05$  mg EGK/100 g do  $525,6778 \pm 0,03$  mg EGK/100 g. Uzorak U5 koji je tretiran 9 minuta i amplitudom od 75 % pokazao je najveći maseni udio ukupnih polifenola ( $525,6778 \pm 0,03$  mg EGK/100 g). Nešto nižu vrijednost udjela ukupnih polifenola pokazao je uzorak U1 tretiran 6 minuta i amplitudom 100 % ( $483,9389 \pm 0,03$  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 ( $456,8556 \pm 0,03$  mg EGK/100 g). Ipak je očekivano najniža izmjerena vrijednost bila kod uzorka U9 koji je podvrgnut tretmanu od 3 minute i amplitudi 50 % ( $375,5722 \pm 0,05$  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 (**121**).

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

Uzorak	Vrijeme [ min]	Amplituda [%]	Ukupni polifenoli [mg EGK/100 g]
U1	6	100	483,9 ± 0,03
U2	6	75	436,5 ± 0,03
U3	9	100	456,9 ± 0,03
U4	9	50	413,2 ± 0,09
U5	9	75	525,7 ± 0,03
U6	3	75	397,7 ± 0,06
U7	6	50	387,0 ± 0,03
U8	3	100	434,3 ± 0,05
U9	3	50	375,6 ± 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	6623,8	1	6623,8	4,30	0,1299
B: vrijeme	5899,76	1	5899,76	3,83	0,1454
AA	1584,21	1	1584,21	1,03	0,3854
AB	57,2141	1	57,2141	0,04	0,8596
BB	7,21873	1	7,21873	0,00	0,9498
Ukupna pogreška	4626,57	3	1542,19	-	-
Ukupna korelacija	18798,8	8	-	-	-

## 4.4 Analiza životnih ciklusa

### 4.4.1 GWP ekstrakcije proteina iz SPK

Kod prerade kave, direktne i indirektno emisije stakleničkih plinova značajno utječu na ukupni potencijal globalnog zatopljenja (GWP). GWP se standardno definira kao umnožak potrošnje energije (kWh) i emisijskog faktora (kg CO<sub>2</sub>/kWh) pa zato GWP nema specifičnu mjeru u konvencionalnim jedinicama kao što su kilogrami ili metri. Umjesto toga, GWP je omjer koji izražava koliko topline određeni plin može „zarobiti“ u atmosferi u odnosu na ekvivalentnu masu ugljičnog dioksida (CO<sub>2</sub>). Stoga se GWP mjeri u odnosu na kilograme ekvivalenta ugljičnog dioksida (kg CO<sub>2</sub>e).

Procjena utroška energije, vode, struje i obrade materijala je ključna za točan izračun GWP postupka procesuiranja 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.) (122), 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 koji uzimaju u obzir čitav životni ciklus proizvoda (123, 124), 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 dobivene postupkom MAE

Redni broj uzorka	Prinos [mg/L]	Energija [kWh]	Vrijeme [min]	GWP [g CO <sub>2</sub> e / ciklusu]
M8	0,5286	5	3	2,59
M9	0,5742	3	3	3,89
M1	0,5215	10	6	5,18
M4	0,5912	10	3	5,18
M3	0,5213	15	9	7,78
M6	0,5926	15	6	7,78
M5	0,6622	20	6	10,37
<b>M7</b>	<b>0,6885</b>	<b>22,5</b>	<b>9</b>	<b>11,67</b>
<b>M2</b>	<b>0,7734</b>	<b>30</b>	<b>9</b>	<b>15,55</b>

Vrijednosti GWP kretale su se od 2,5924 g CO<sub>2</sub>e/ciklusu (uzorak M8) do čak 15,5544 g CO<sub>2</sub>e/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 se zatim na temelju emisijskog faktora energije izračunati emisiju CO<sub>2</sub>. Podaci za snagu kod UAE su navedeni u **Tablici 26** te je prema njima izračunata prilagođena snaga. Uz preračunavanje Emisijskog faktora koji iznosi 0,51848 kg CO<sub>2</sub> / kWh, može se izračunati Emisija CO<sub>2</sub> (kg) na isti način kao i kod mikrovalne ekstrakcije.

**Tablica 26.** Prosječne vrijednosti parametara praćenih tijekom izvođenja UAE

Uzorak	Vrijeme [min]	Amplituda [%]	Temperatura [°C]	Snaga [W]	Energija [J]	dT	Ukupna promjena [J s <sup>-1</sup> ]*
<b>U1</b>	6	100	18,042 ± 0,235	68,236 ± 0,276	14256,51 ± 0,518	1,000± 0,833	4,367±0,270
<b>U2</b>	6	75	18,542 ± 0,171	61,854 ± 0,114	12235,22 ± 0,534	0,917± 1,588	4,077±0,572
<b>U3</b>	9	100	20,185 ± 0,320	63,676 ± 0,324	19447,380 ± 0,497	1,185± 1,290	5,497±0,341
<b>U4</b>	9	50	17,111 ± 0,140	48,042 ± 0,075	13727,167 ± 0,556	0,819± 1,933	3,233±0,807
<b>U5</b>	9	75	19,852 ± 0,357	60,741 ± 0,177	18151,546 ± 0,528	1,824± 1,338	9,040±0,292
<b>U6</b>	3	75	22,375 ± 0,124	69,583 ± 0,018	6585,208 ± 0,548	1,000± 1,323	5,018±0,409
<b>U7</b>	6	50	21,639 ± 0,164	49,750 ± 0,045	9401,944 ± 0,552	0,819± 2,097	4,482±0,556
<b>U8</b>	3	100	25,875 ± 0,102	85,167 ± 0,032	8203,708 ± 0,526	1,208± 0,755	4,273±0,265
<b>U9</b>	3	50	20,639 ± 0,092	50,722 ± 0,031	4890,222 ± 0,533	0,306± 1,693	2,123±0,341

\* masa uzorka iznosi 110 g, a specifični toplinski kapacitet uzorka iznosi 1,5114 J K<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>

U **Tablici 27** su prikazane vrijednosti GWP-a postupaka dobivanja proteinskih ekstrakata u različitim uvjetima UAE, prema rastućim vrijednostima.

**Tablica 27.** Rezultati izračuna GWP postupaka dobivanja proteinskih ekstrakata u različitim uvjetima UAE, prema rastućim vrijednostima

Redni broj uzorka	Prinos [mg/L]	Energija [kWh]	Vrijeme [min]	GWP [g CO <sub>2e</sub> / ciklusu]
U9	0,6617	0,001358	3	1,31
U6	0,6110	0,001829	3	1,80
U8	1,1012	0,002279	3	2,21
U7	0,5126	0,002611	6	2,58
U2	0,7368	0,003399	6	3,21
U1	0,8705	0,00396	6	3,54
U4	0,7062	0,003813	9	3,74
U5	0,6213	0,005042	9	4,72
<b>U3</b>	<b>0,8715</b>	<b>0,005402</b>	<b>9</b>	<b>4,95</b>

Iz navedenih podataka vidljivo je da najveći potencijal globalnog zatopljenja ima uzorak U3 s GWP od 4,95 g CO<sub>2e</sub>, 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. (Pearson r prinos-energija =0,1344, a Pearson r prinos-GWP=1,1063)

#### **4.4.2 GWP proteinskih ekstrakta SPK dobivenih procesom UAE kroz LCA**

Na temelju prethodno dobivenih podataka utvrđeno je da je proces UAE prihvatljiviji postupak 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.

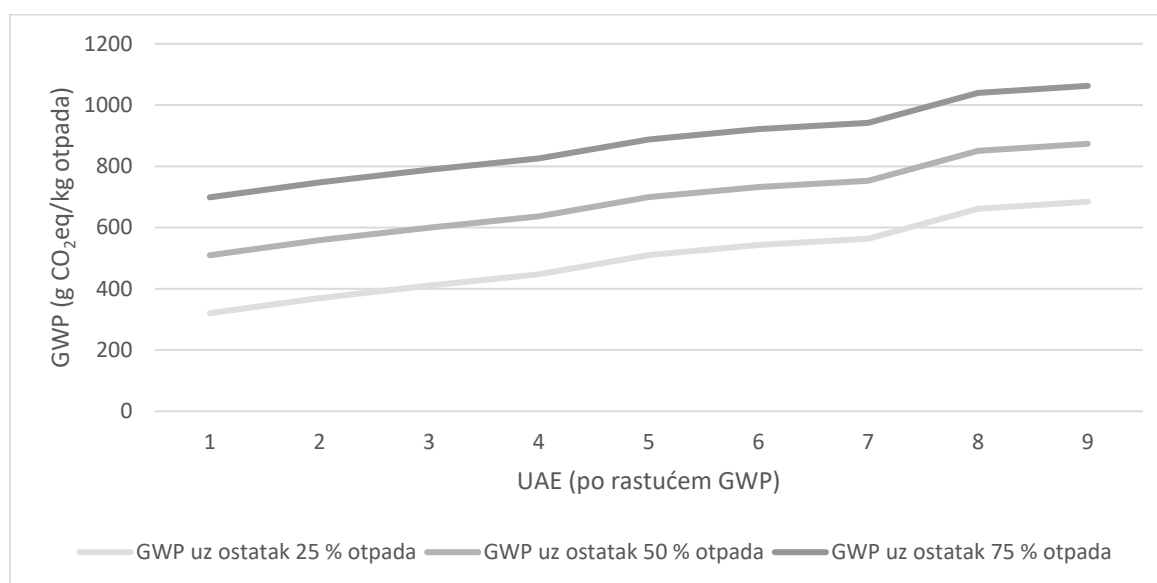
Rezultati pokazuju da GWP ekstrakcijskog postupka za uzorke SPK U1-U9 iznosi 1,31 – 4,95 g CO<sub>2e</sub>/uzorku odnosno 131 – 495 g CO<sub>2e</sub>/kg otpada (uz pretpostavku da je prosječna količina otpada koji zaostaje nakon ciklusa ekstrakcije oko 50 %, a što je utvrđeno tijekom laboratorijskih 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 (**125**) 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 scenarijama nastale količine otpada koja se odlaže na odlagalište.

Redni broj uzorka	GWP [g CO <sub>2</sub> e / kg otpada] Uz ostatak 25 % otpada	GWP [g CO <sub>2</sub> e / kg otpada] Uz ostatak 50 % otpada	GWP [g CO <sub>2</sub> e / kg otpada] Uz ostatak 75 % otpada
U9	320,24	509,5	698,71
U6	369,24	558,5	747,71
U8	410,24	599,5	788,71
U7	447,24	636,5	825,71
U2	510,24	699,5	887,71
U1	543,24	732,5	921,71
U4	563,24	752,5	941,71
U5	661,24	850,5	1039,71
U3	684,24	873,5	1062,71

S obzirom na dobivene rezultate može se grafički prikazati kako GWP gotovo linearno raste s povećanjem ostatka postotka otpada, prema **Slici 26** (GWP uzoraka su aritmetički poredani po rastućim vrijednostima):



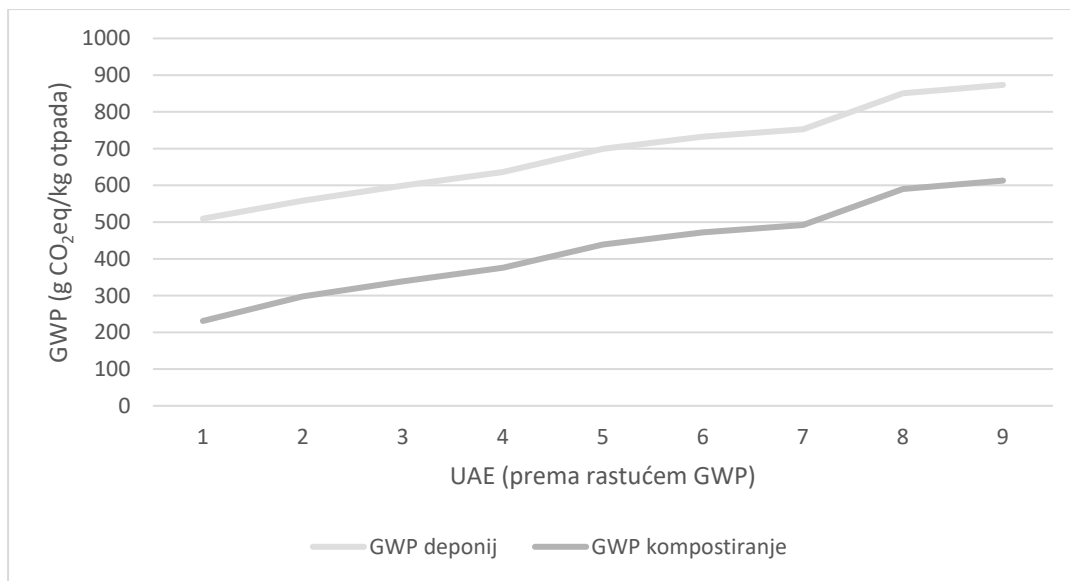
**Slika 26.** Prikaz ovisnosti GWP uz variranje otpadne SPK

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	509,5	231
U6	558,5	298
U8	599,5	339
U7	636,5	376
U2	699,5	439
U1	732,5	472
U4	752,5	492
U5	850,5	590
U3	873,5	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 27**.



**Slika 27.** Usporedni prikaz rasta GWP deponij VS kompostiranje

## **5. RASPRAVA**

## 5.1 Zdravstvena ispravnost SPK

Zdravstvena ispravnost SPK vrlo je važna ako ovaj nusproizvod želimo promatrati kao potencijalno vrijednu sekundarnu sirovinu s mogućnošću primjene u prehrambenoj ili farmaceutskoj industriji. Dostupna znanstvena istraživanja izuzetno 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 (126). Prema dostupnim podacima, prisutnost ostataka pesticida također je minimalna, te se procjenjuje da ne predstavlja značajan zdravstveni rizik. U našem 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, a najveću koncentraciju ima nikal ( $2,495 \pm 0,055$  mg/kg), 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 uzorku SPK, 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 (115) 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 (116) 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 u miješanom uzorku SPK, od

Martuscelli i sur. (117). Sve su te razlike vjerojatno bile povezane sa sastavom miješanih uzoraka SPK (% obje 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, ali procjenom objavljenih rezultata nisu ustanovljeni toksični učinci SPK, koji nisu bili niti očekivani. Općenito, možemo zaključiti da SPK možemo koristiti kao sekundarnu sirovinu u proizvodnji novih prehrambenih proizvoda ili kao dodataka prehrani.

## **5.2 Valorizacija SPK kao sekundarne sirovine za dobivanje proteina – usporedba MAE i UAE**

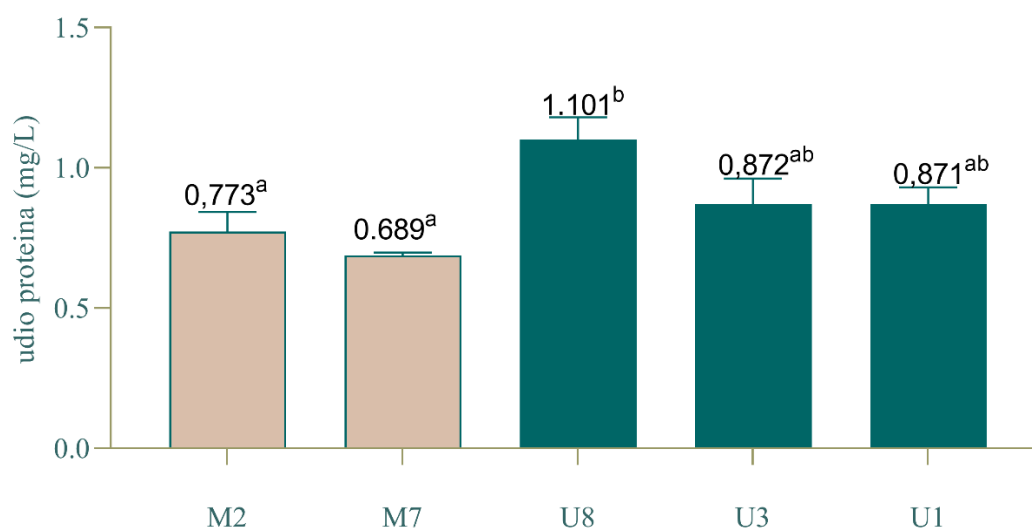
Istraživanje alternativnih izvora proteina za ljudsku prehranu sve je važnije u kontekstu neodrživosti i nefunkcionalnosti postojećeg sustava opskrbe hranom. Uzimajući u obzir rast globalne populacije koja će do 2050. godine dosegnuti gotovo 10 milijardi ljudi jasno je da će tradicionalni izvori životinjskih 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.

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 našeg 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 koje uobičajeno traju oko 24 sata, prinosi dobiveni procesom UAE značajno su veći (**Slika 28**). Moguća je samo parcijalna usporedba dobivenih podataka s postojećim literaturnim podacima s obzirom da, prema trenutnim saznanjima, ne postoji istraživanje mogućnosti ekstrakcije proteina vodom kao ekstrakcijskim sredstvom.



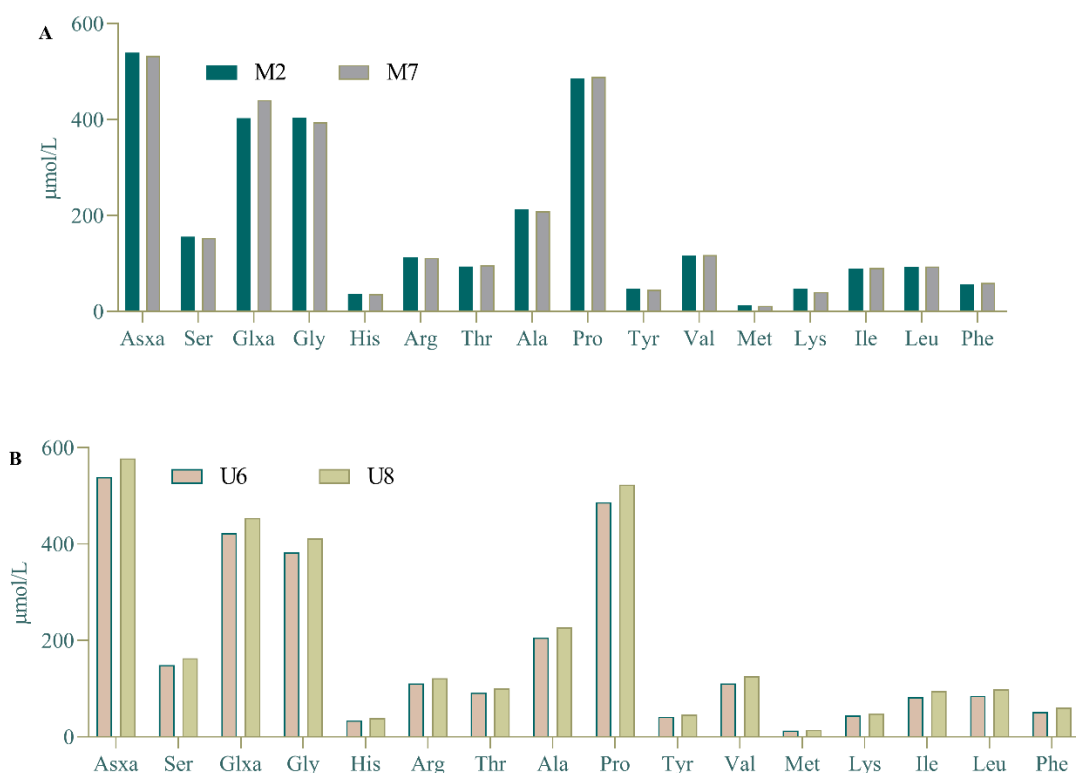
**Slika 28.** Usporedba prinosa proteina (mg/L) dobivenih u izabranim uvjetima MAE (M) i UAE (U) (s najvećim prinosima).

\*M2-9min/200W; M7-9min/150W; U8-3min/100%; U3-9min/100%; U1-6min/100min. 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 sa UAE (10 min). Kao i u našim istraživanjima prinosi su se povećavali s porastom amplitude ultrazvučne sonde odnosno jakčine 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 ekstrakcije (**Slika 29**). Važno je napomenuti da su u proteinskim ekstraktima bile prisutne sve esencijalne aminokiseline. Pri tome je ustanovljeno 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 vjerojatno su posljedica različitih uvjeta ekstrakcije (sukcesivna primjena kiseline i lužine naspram primjene vode kao ekstrakcijskog otapala). U navedenim ekstraktima nisu detektirane sve esencijalne aminokiseline, a prisutnost određenih aminokiselina varirala je s obzirom na koncentraciju otapala korištenog za ekstrakciju.



**Slika 29.** Usporedba aminokiselinskog sastava proteinskih ekstrakata dobivenih postupcima MAE (Slika A) i UAE (Slika B) u odabranim uvjetima pri kojima su postignuti najveći prinosi.

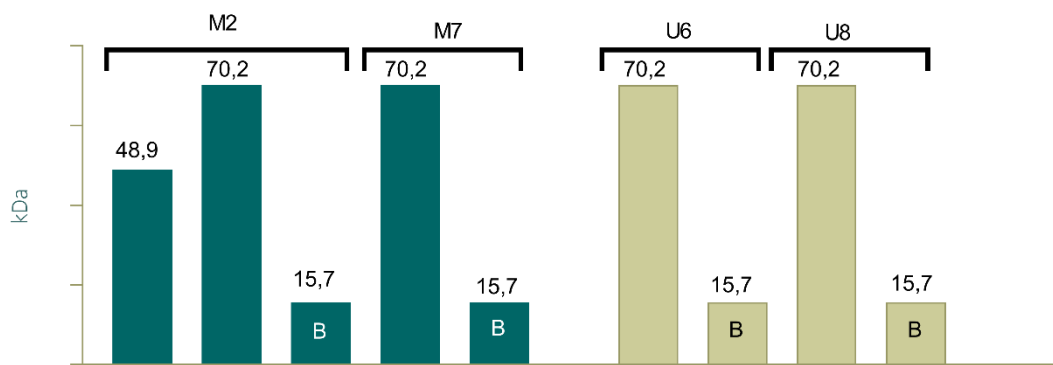
Osim njihove vrijednosti kao esencijalnih nutrijenata, proteine možemo promatrati i kao

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; na primjer, goveđe 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 **(127, 128)**. Proteini koji sadrže Barwin 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 istražena, 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 ih čini potencijalno značajnima za biotehnološke primjene u poljoprivredi i medicini **(118)**.

U okviru ovog istraživanja provedena je karakterizacija proteina SPK dobivenih

postupcima MAE i UAE te je istražena prisutnost Barwinove domene, a kako bi se utvrdio potencijal dobivanja bioaktivnih peptida iz analiziranih proteinskih ekstrakata.

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 30**).



**Slika 30.** Mase najzastupljenijih proteina u ekstraktima SPK dobivenim UAE i MAE postupcima s najvećim prinosima.

\*M2-9min/200W; M7-9min/150W; U8-3min/100%; U1-6min/100min. 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 pri čemu se kao glavni čimbenik koji će definirati veličinu proteina u ekstraktu pH Wen i sur. su u svom istraživanju (46) uspoređivali 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 međusobno se nisu značajno razlikovali.

### 5.3 Valorizacija SPK kao sekundarne sirovine za dobivanje polifenola – usporedba MAE i UAE

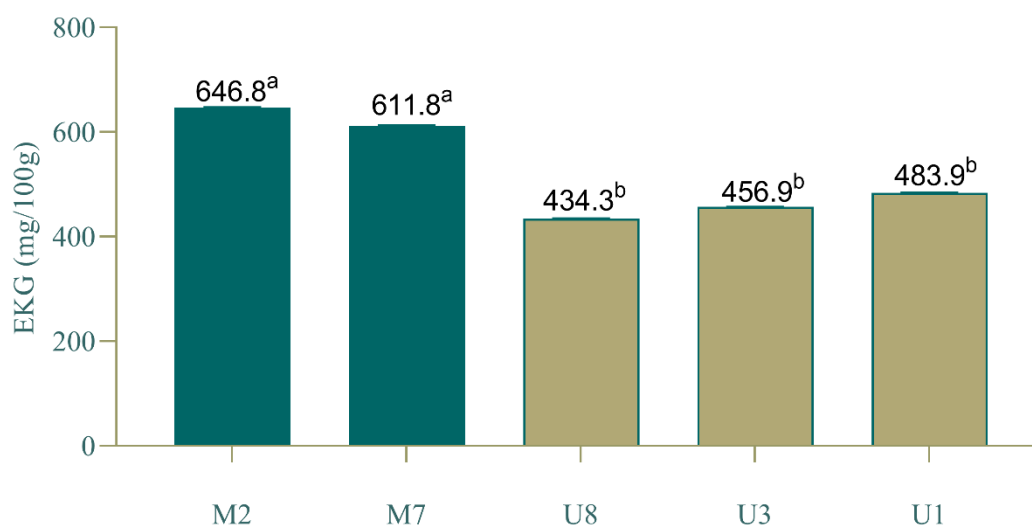
SPK je u posljednjih desetak godina prepoznat kao potencijalno vrijedan izvor polifenolnih spojeva te su već istražene prednosti i nedostaci različitih vrsta ekstrakcije, od klasične ekstrakcije otapalom (maceracije) do primjene zelenih ekstrakcijskih tehnika (UAE, MAE i slično). Iz rezultata dostupnih u literaturi 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 procesuiranja mogu značajno utjecati na količinu ukupnih fenola 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<sup>-1</sup> do 1282 mg 100 g<sup>-1</sup> (izraženo kao ekvivalenti galne kiseline - EGK) **(53)**. Zhang i suradnici su primjenom UAE dobili ekstrakte sa sadržajem ukupnih polifenola od 286 ± 0.08 mg EGK 100 g<sup>-1</sup> **(76)**. Wen i suradnici proveli su istraživanje slično našem – optimirali su MAE ekstrakciju polifenola iz SPK korištenjem deionizirane vode kao otapalo. U svom su istraživanju pokazali da se maksimalni prinosi polifenola (600 ± 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<sup>-1</sup>) koji su vodene ekstrakte dobili postupkom UAE u trajanju od čak 120 min (40 Hz/20C) **(129)** iz čega je vidljivo da produljeno vrijeme ekstrakcije rezultira povećanim prinosima polifenola. Primjenom kiselinske ili lužnate ekstrakcije također se mogu ostvariti nešto viši prinosi polifenola. Mussatto i suradnici su dokazali da povišena temperatura te korištenje kiseline i lužine rezultiraju značajno višim prinosima polifenola u ekstraktima u odnosu na vodu **(130)**.

Glavni cilj našeg 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 kako bi se dobio kombinirani produkt povećane funkcionalnosti. Naime, dobivanje proteinskih ekstrakata

bogatih polifenolima iz sirovina nudi značajne prednosti u odnosu na standardne proteinske ekstrakte bez tih spojeva. Naime 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 dodatak prehrani (**131, 132**) Stoga integracija proteinskih ekstrakata bogatih polifenolima predstavlja obećavajući put za inovacije u prehrambenoj tehnologiji i primjenama povezanim sa zdravljem.

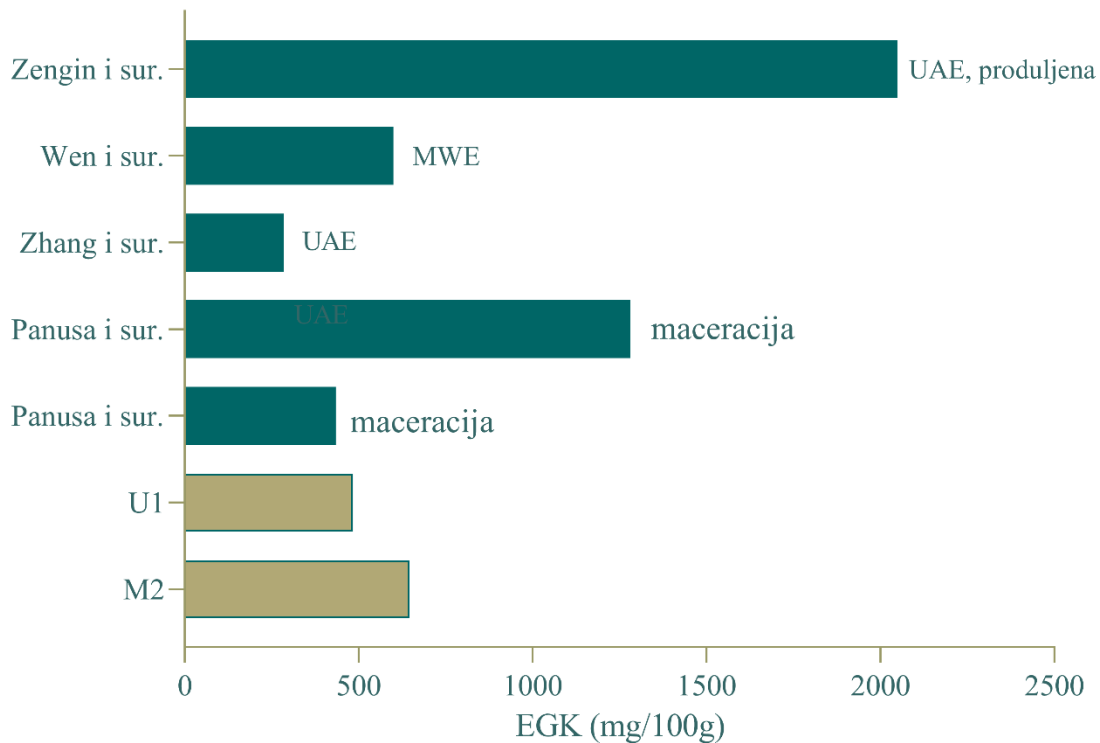
Rezultati našeg istraživanja pokazali su da se u uvjetima optimalnim za ekstrakciju proteina iz SPK ekstrahira i značajna količina polifenola, pri čemu se ipak, MAE pokazala značajno boljom od UAE (što nije slučaj s ekstrakcijom proteina) (**Slika 31**). Vrijednosti udjela polifenola u ekstraktima s najvećim prinosima proteina kretale su se od 434.3 mg/100g EKG (U8) do 646.8 (M2). Promjena uvjeta ekstrakcije za svaku od primijenjenih ekstrakcijskih tehnika, u rasponima definiranim za optimizaciju ekstrakcije proteina, nisu značajno utjecale na prinose polifenola.



**Slika 31.** Udio polifenola (EKG) u MAE (M) i UAE (U) ekstraktima SPK s najvećim prinosima proteina.

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

Prinosi polifenola ostvareni u ovoj studiji 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 optimiranim za ekstrakciju fenolnih komponenti (**Slika 32**).



**Slika 32.** Usporedba udjela polifenola u MAE i UAE ekstraktima SPK (najviše vrijednosti) i udjela polifenola u ekstraktima SPK dostupnim u literaturi.

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 nemoguće izvlačiti, zbog velike varijabilnosti uvjeta ekstrakcije koje su koristili različiti autori (tehnika, otapalo, omjer mase uzorka i volumena otapala, trajanje ekstrakcije, temperatura ekstrakcije). Osim toga, važno je napomenuti da je udio polifenola u bilo kojoj sirovini, uključujući i SPK, izrazito varijabilan te ovisi o sortimentu, agroklimatskim uvjetima u kojima je biljka rasla, načinu prikupljanja, načinu skladištenja te načinu predprocesuiranja sirovine (**133, 134**). Također se napominje da je u svim citiranim istraživanjima 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 (135, 136).

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 SPK – 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 (137) Nadalje, u kontekstu porasta potražnje za održivim proizvodima raste, 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.

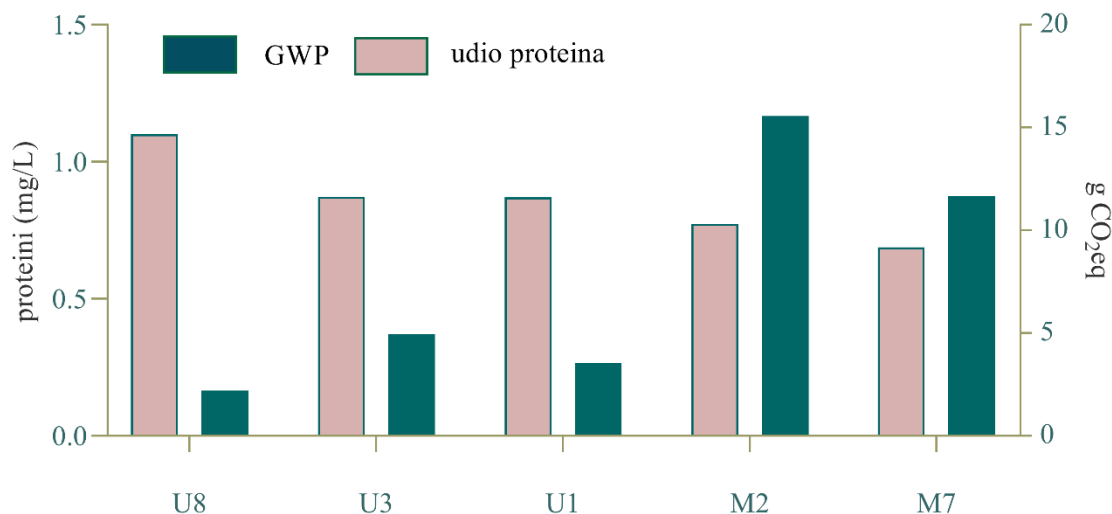
Procjena životnog ciklusa (LCA) procjenjuje nekoliko vrsta ekoloških otisaka te omogućuje sveobuhvatno razumijevanje utjecaja proizvoda na okoliš tijekom cijelog životnog ciklusa. Ključne vrste ekoloških otisaka koje procjenjuje LCA uključuju ugljični otisak koji mjeri emisije stakleničkih plinova; vodeni 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 fokusirano 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 preferiranim izborom u kontekstu smanjenja utjecaja na okoliš. Usporedbe ugljičnog otiska UAE i MAE postupaka u literaturi, prema trenutnim saznanjima, ne postoje te je ovo istraživanje bilo fokusirano 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 33**).





**Slika 33.** Prinosi proteina i GWP/ciklusu za odabrane uvjete UAE i MAE

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, otapala i učinkovitost procesa.

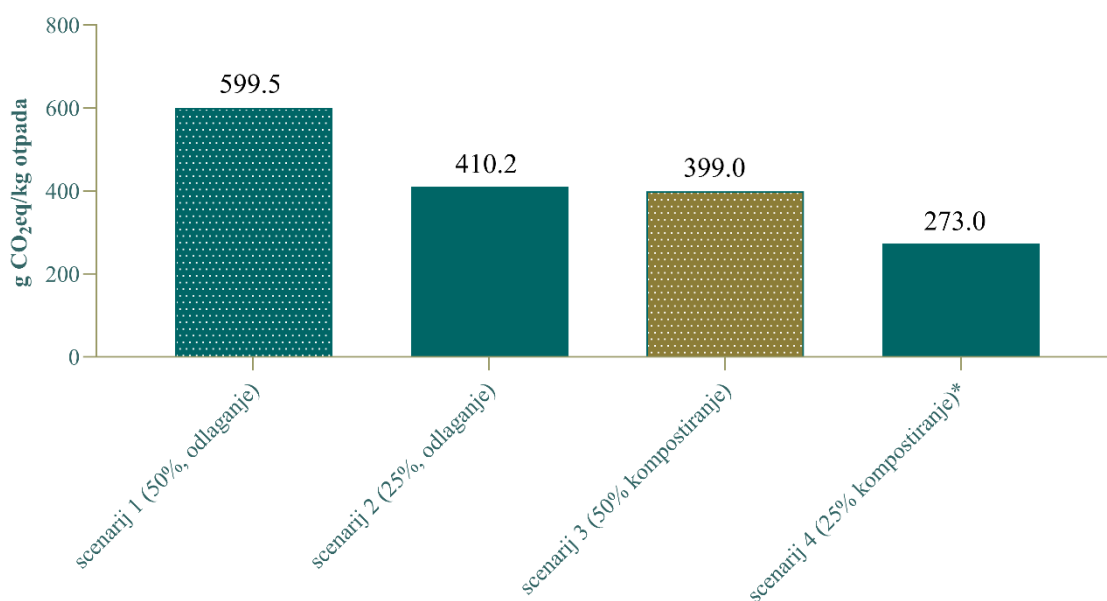
Ako se razmotre rezultati GWP različitih uvjeta UAE, proizlazi da najveći potencijal globalnog zagrijavanja ima uzorak U3 s GWP od 4,95 g CO<sub>2e</sub>, odnosno da porastom vremena tretiranja uzorka dolazi do povećanja istog, uz linearno povećanje amplitude. Međutim, povećanje je intenzivnije povećanjem vremena.

Iz navedenog primjera razvidno je kako se ekološka prihvatljivost procesa dobivanja nekog produkta može poboljšavati s više aspekata – odabirom sekundarne sirovine čime se minimalizira ekološki otisak i potencijal iscrpljivanja resursa; odabirom vode kao ekstrakcijskog sredstva (čime se minimalizira 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 studije 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 **(125)**. 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 CO<sub>2e</sub>/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 koncepata 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 postupka koji bi generirali manje količine otpada (scenarij 3 i scenarij 4). Ukupni GWP za sva četiri scenarija prikazan je na **Slici 34**.



**Slika 34.** GWP dobivanja proteinskog ekstrakta SPK primjenom optimalnog UAE postupka (U8) u različitim scenarijima količine nastalog otpada i procesuiranja otpada.

\*procijenjeni utjecaj kombiniranog postupka kompostiranja i smanjenja količine zaostalog otpada

Iz **Slike 34** 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 zagrijavanja od CO<sub>2</sub>, 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 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 detektirana tri pesticida i to flutriafol, imidaklopid i piperonil butoksid. Od teških metala, u korištenim uzorcima najvišu koncentraciju imao je nikal ( $2,495 \pm 0,055$  mg/kg), a u puno manjim koncentracijama detektirani 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. UAE je prihvatljivija tehnika za dobivanje proteina iz SPK. Naime, iako i UAE i MAE 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 ( $0,7734 \pm 0,07$  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 ( $1,1012 \pm 0,08$  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.
3. 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.
4. 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 što ukazuje na potencijal za dobivanje bioaktivnih peptida.
5. 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 EKG (U8) do 646,8 mg/100 g EKG (M2). Promjena uvjeta ekstrakcije za svaku od primijenjenih ekstrakcijskih tehnika, u rasponima definiranim za optimizaciju ekstrakcije proteina, nisu značajno utjecale na prinose polifenola.
6. Iako se MAE i UAE mogu smatrati generalno 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 GWP (2,21-4,95 g CO<sub>2</sub>e/ciklusu u UAE s najvišim prinosima proteina naspram 11,67-15,55 g CO<sub>2</sub>e/ciklusu u MAE s najvišim prinosima proteina), a što je u skladu s očekivanjima s obzirom na razlike u potrošnji energije kod UAE i MAE.

7. Ukupni GWP proteinskih ekstrakata dobivenih iz SPK proporcionalan je količini otpada koji zaostaje nakon procesa ekstrakcije pa optimizacija procesuiranja (u smislu minimalizacije nastajanja otpada) može značajno smanjiti GWP, odnosno 599,5 g CO<sub>2</sub>e (50 % otpada) naspram 410,2 g CO<sub>2</sub>e (25 % otpada). Dodatno smanjenje GWP može se postići kompostiranjem preostalog otpada (599,5 g CO<sub>2</sub>e (50 % otpada, odlaganje) naspram 399 g CO<sub>2</sub>e (50 % otpada, kompostiranje).

## **7. POPIS LITERATURE**



1. Morris, J. Coffee (2019) - a global history, 1<sup>st</sup> edition, UK
2. Pravilnik o kavi, kavovinama te proizvodima od kave i kavovina, NN 172/2004
3. Klingel, T., Kremer, J.I., Gottstein, V., Rajcic de Rezende, T., Schwarz, S., Lachenmeier, D.W. (2020) A Review of Coffee By-Products Including Leaf, Flower, Cherry, Husk, Silver Skin, and Spent Grounds as Novel Foods within the European Union. *Foods*, 9(5), 665.
4. Iriundo-DeHond, A., Fernandez-Gomez, B., Martinez-Saez, N., Martirosyan, D.M., Garcia, M.D.M., del Castillo, M.D. (2017) Coffee Silverskin: A Low-Cost Substrate for Bioproduction of High-Value Health Promoting Products. *Ann. Nutr. Food Sci.*, 1, str. 1-6.
5. Bessada, S.M.F., Alves, R. C., Oliveira, M.B.P.P. (2018) Coffee Silverskin: A review on Potential Cosmetic Applications. *Cosmetics*, 5(1), 5.
6. Borrelli, R.C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A., Fogliano, V. (2004) Characterization of a New Potential Functional Ingridient: Coffee Silverskin. *J. Agric. Food Chem.*, 52, str. 1338-1343.
7. Ballesteros, L.F., Teixeira, J.A., Mussatto, S.I. (2014) Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food Bioprocess Tech.*, 7, str. 3494-3503.
8. De Marco, I., Riemma, S., Iannone, R. (2018) Life cycle assessment of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of caffeine from coffee beans. *J. Supercrit. Fluid.* 133, 393-400.
9. Martinez-Saez, N., Ullate, M., Martin-Cabrejas, M.A., Martorell, P., Genovés, S., Ramon, D., del Castillo, M.D. (2014) A novel antioxidant beverage for body weight control based on coffee silverskin. *Food Chem.* 150, 227-234.
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 (2021) Coffee comes full circle: First ever 3D printed coffee station made from waste. <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. Mechanisms of Amino Acid Formation in Interstellar Ice Analogs  
Jamie E. Elsila<sup>1,2</sup>, Jason P. Dworkin<sup>3</sup>, Max P. Bernstein<sup>1</sup>, Mildred P. Martin<sup>3,4</sup>, and Scott A. Sandford<sup>1</sup>, 2007, <https://iopscience.iop.org/article/10.1086/513141>

13. Azulay, H.; Lutaty, A.; Qvit, N. How Similar Are Proteins and Origami? *Biomolecules* 2022, 12, 622. <https://doi.org/10.3390/biom12050622>
14. Karlson P (1993) *Biokemija za studente kemije i medicine*. 7.izd., (preveli Mildner, P., Mildner,B.), Školska knjiga, Zagreb, str. 20-45.
15. Prandi B, Ferri M, Monari S, Zurlini C, Cigognini I, Verstringe S, i sur. (2021) Extraction and chemical characterization of functional phenols and proteins from coffee (*Coffea arabica*) by-products. *Biomolecules* 11. <https://doi.org/10.3390/biom11111571>
16. Hardman WE (2014) Diet components can suppress inflammation and reduce cancer risk. *Nutr. Res. Pract.* 8 (3), 233-240. <https://doi.org/10.4162/ntp.2014.8.3.233>
17. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* 81(1), 215-217. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.2155>
18. Adams, D. (2017) *Insecticides and Pesticides: Techniques for Crop Protection*, Library Press, New York.
19. Jurak, G. i Sabljak, I. (2020) Što o proizvodima biljnog podrijetla na Hrvatskom tržištu govore analize ostataka pesticida?. *Glasilo biljne zaštite*, 20, str. 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. (2004) *Chronic Intake. U: Pesticide Residues in Food and Drinking Water: Human Exposure and Risks*, (Hamilton D. i Crossley S., ured.), John Wiley & Sons, New Jersey, str. 213-223.
22. Krivohlavek, A.; Palac Bešlić, I.; Jurak, G.; Gavran, M.; Mandić Andačić, I.; Ivešić, M.; Šikić, S.; Vitale, K.; Štefančić, M.; Žuntar, I.; et al. Heavy Metals and Pesticide Residues in Small Farm Cheese Production in Croatia—Challenge between Quality and Quantity. *Sustainability* 2024, 16, 1356. <https://doi.org/10.3390/su16041356>
23. Galić, K. (2010) *Metali i slitine. Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*, (Hengl, B., ured.), Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek, str. 150-167.
24. Akram, M., Munir, N., Daniyal, M., Egbuna, C., Gaman, M.A., Onyekere, P.F., Olatunde, A. (2020) *Vitamins and Minerals: Types, Sources and thair Functions. U: Functional Foods and Nutraceuticals* (Egbuna C., Dable Tupas G., ured.), Springer, Cham, str. 149-172.

25. Vranešić Bender, D. i Krstev, S. (2008) Makronutrijenti i mikronutrijenti u prehrani čovjeka. *Medicus*, 17, str. 19-25.
26. 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. <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, e04691. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>.
28. 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. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76082>.
29. Zakon o kontaminantima (NN 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 (NN 16/2005)
32. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, i sur. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* 117, 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodengl.2013.01.014>
33. Pavlović DM, Ašperger D, Tolić D, Babić S (2013) Development and optimization of the determination of pharmaceuticals in water samples by SPE and HPLC with diode-array detection. *J Sep Sci* 36. <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*, 219. <https://doi.org/10.3390/min14030219>
35. Orsat V, Raghavan GSV, Krishnaswamy K (2017) *The Microwave Processing of Foods*, 2.izd., Woodhead publishing, Cambridge
36. Puligundla P (2013) Potentials of Microwave Heating Technology for Select Food Processing Applications - a Brief Overview and Update. *J Food Process Technol* 4. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000278>
37. Kaderides K, Papaoikonomou L, Serafim M, Goula AM (2019) Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics,

- and comparison with ultrasounds extraction. *Chem Eng Process - Process Intensif* 137, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.01.006>
38. Vinatoru M, Mason TJ, Calinescu I (2017) Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 97, 159-178. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>
39. Ajila CM, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Godbout S, Valéro JR (2011) Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Crit. Rev. Biotechnol.* 31(3), 227-249. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513677>
40. Chan CH, Yusoff R, Ngoh GC, Kung FWL (2011) Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *J. Chromatogr. A* 1218 (37), 6213-6225. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.040>
41. Jayasooriya, S. D., Bhandari, B. R., Torley, P., D'arcy, B. R. (2004) Effect of high power ultrasound waves on properties of meat. *Int. J. Food Prop.* 7, 301-319. doi:10.1081/JFP- 120030039
42. Ercan, S.S., Soysal, C. (2013) Use of ultrasound in food preservation. *Nat. Sci.* 5, 5-13. doi:10.4236/ns.2013.58A2002
43. Alternative methods for RuBisCO extraction from sugar beet waste: A comparative approach of ultrasound and high voltage electrical discharge  
*Ultrasonics Sonochemistry* (IF 8.4) Pub Date: 2023-07-27, DOI:10.1016/j.ultsonch.2023.106535
44. Leighton, T. G. (2007) What is ultrasound?. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 93, 3-83. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.026
45. Mazzotta, S.; Lettieri, S.; Ferraro, G.; Bartoli, M.; Etzi, M.; Pirri, C.F.; Bocchini, S. A Concise Overview of Ultrasound-Assisted Techniques for the Production of 2D Materials. *Processes* 2024, 12, 759. <https://doi.org/10.3390/pr12040759>
46. Wen, L., Alvarez, C., Zhang, Z., Poojary, MM., Lund M, Da-Wen, S., Tiwari BK. Optimisation and characterisation of protein extraction from coffee silverskin assisted by ultrasound or microwave techniques. *Biomass Conv. Bioref.* 2020, 11, 1575–1585. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00712-2>
47. Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 2, 22-33.

48. Kardos, N., Luche, J. L. (2001) Sonochemistry of carbohydrate compounds. *Carbohydr. res.* 332, 115-131. doi:10.1016/S0008-6215(01)00081-7
49. Tiwari, B. K. (2015) Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends Analyt. Chem.*, 71, 100-109. doi:10.1016/j.trac.2015.04.013
50. Chemat, F., Khan, M. K. (2011) Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochem.* 18, 813-835. doi:10.1016/j.ultsonch.2010.11.023
51. Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials. *J. Food Engl.* 117, 426-436. doi:10.1016/j.jfoodengl.2013.01.01
52. Radojčić Redovniković, I. (2020) Osvežimo znanje: Zelena otapala. *KUI*, 69, 670-671.
53. Panusa, A., Petrucci, R., Lavecchia, R., Zuorro, A. (2017) UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS metabolic profiling and antioxidant capacity of arabica and robusta coffee silverskin: Antioxidants vs phytotoxins. *Food Res. Int.*, 99, 155-165. doi:10.1016/j.foodres.2020.109128
54. European Platform on Life Cycle Assessment. <https://eplca.jrc.ec.europa.eu/lifecycleassessment.html> pristupljeno 18.10.2023.
55. International Organization for Standardization, ISO 14000 <https://www.iso.org/standards/popular/iso-14000-family> pristupljeno 19.10.2023.
56. Curran, M.A., Goal and Scope Definition in Life Cycle Assessment, 2017
57. International Organization for Standardization ISO EC 207,1997 <https://www.iso.org/committee/54808.html>
58. Sandholzer D. (2006) Ecological Evaluation of Processes from Renewable Resources. PhD Thesis, Institute for Resource Efficient and Sustainable Systems, Graz University of Technology.
59. Krotscheck C., Narodoslowsky M., The Sustainable Process Index a new dimension in ecological evaluation, *Ecological Engineering*, Volume 6, Issue 4, 1996, Pages 241-258, ISSN 0925-8574, [https://doi.org/10.1016/0925-8574\(95\)00060-7](https://doi.org/10.1016/0925-8574(95)00060-7).
60. International Organization for Standardization, ISO 59000 <https://www.iso.org/standard/80648.html> pristupljeno 18.10.2023.

61. International Organization for Standardization, ISO 59000, ISO 59004:2024  
Kružno gospodarstvo — Rječnik, načela i smjernice za provedbu  
<https://www.iso.org/standard/80648.html#lifecycle>
62. <https://eur-lex.europa.eu/HR/legal-content/summary/european-climate-law.html>
63. Europski znanstveni savjetodavni odbor za klimatske promjene,
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](https://climate.ec.europa.eu/eu-action/eu-emissions-trading-system-eu-ets_en) pristupljeno 28.10.2023.
70. Udio energije iz obnovljivih izvora energije u 2021. godini (Eurostat)
71. Direktiva (EU) 2018/2001 o promicanju uporabe energije iz obnovljivih izvora  
[https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L\\_.2018.328.01.0082.01.HRV](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L_.2018.328.01.0082.01.HRV) pristupljeno 29.10.2023.
72. 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.
73. Manna L, Bugnone C, Banchemo M. Valorization of hazelnut, coffee and grape wastes through supercritical fluid extraction of triglycerides and polyphenols. J Supercrit Fluids 2015; 104: 204-11.
74. Pleissner D. Recycling and reuse of food waste. Curr. Opin. Green Sustain. Chem. 2018; 13:39-43.

75. Chemat F, Abert Vian M, Cravotto G. Green extraction of natural products: concept and principles. *Int. J. Mol. Sci* 2012; 13: 8615-27.
76. Zhang Z, Poojary M, Choudhary A, Rai D, Lund M, Tiwari B. 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: 2273-82.
77. Wen L, Álvarez C, Zhang Z, Poojary M M, Lund M N, Sun D W et al. Optimisation and characterisation of protein extraction from coffee silverskin assisted by ultrasound or microwave techniques. *Biomass Convers Biorefin* 2021; 11: 1575-85.
78. Hrvatski zavod za norme, HRN EN ISO 14000 - Upravljanje okolišem. Preuzeto s: <https://www.hzn.hr/default.aspx?id=53> pristupljeno: 15.12.2023.
79. 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: 1-4.
80. Djekic I, Sanjuán N, Clemente G, Jambrak A, Djukić-Vuković A, Brodnjak U et al. Review on environmental models in the food chain - Current status and future perspectives. *J Clean Prod* 2018; 176: 1012-25.
81. Anastassiades M, Lehotay S, Tajnbaher D, Schenck F. 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: 412-31.
82. Rai P K, Lee S S, Zhang M, Tsang Y F, Kim K H. Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environ Int.* 2019; 125: 365-85.
83. Vinatoru M, Mason T, Calinescu I. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *Trends Analyt Chem* 2017; 97: 159-78.
84. STATGRAPHICS Centurion StatPoint technologies, Inc., VA 20186, USA <https://www.statgraphics.com/> pristupljeno: 29.10. 2023.
85. Stoscheck CM. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology* 1990;182: 50-69.
86. 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.

87. Christodoulou MC, Orellana Palacios JC, Hesami G, Jafarzadeh S, Lorenzo JM, Domínguez R, Moreno A, Hadidi M. Spectrophotometric Methods for Measurement of Antioxidant Activity in Food and Pharmaceuticals. *Antioxidants*. 2022; 11(11):2213.
88. Irvine, GB. Determination of Molecular Size by Size-Exclusion Chromatography (Gel Filtration). *Curr Protoc Cell Biol* 2000; 6: 51-55.
89. SimaPro. Introduction to LCA with SimaPro. Preuzeto s: <https://preustainability.com/legacy/download/SimaPro8IntroductionToLCA.pdf> pristupljeno: 16. prosinca 2023.
90. 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.
91. Upravitelj aplikacija TargetLynx [https://www.waters.com/waters/library.htm?locale=en\\_US&lid=1545580](https://www.waters.com/waters/library.htm?locale=en_US&lid=1545580) pristupljeno: 25.10. 2023.
92. Mæhre, H.K.; Dalheim, L.; Edvinsen, G.K.; Elvevoll, E.O.; Jensen, I.-J. Protein Determination—Method Matters. *Foods* 2018, 7, 5. <https://doi.org/10.3390/foods7010005>
93. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 850-858. doi:10.1021/ac950914h
94. MALDI-TOF/TOF upute za spektrometar masa <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mass-spectrometry/maldi-tof.html> pristupljeno: 25.10. 2023.
95. UniProt baza podataka, <https://www.uniprot.org/>, pristupljeno 26.02.2021. i 17.04.2023.
96. Shortle E, O'Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci* 98. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>
97. <http://www.ccalc.org.uk/contact.php>, pristupljeno: 15.10. 2023.
98. Zakon o klimatskim promjenama i zaštiti ozonskog sloja, NN 127/2019



99. 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. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03327>.
100. Pizzutti, I.R.; de Kok, A.; Dickow Cardoso, C.; Reichert, B.; de Kroon, M.; Wind, W.; Weber Righi, L.; Caiel 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. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.06.041>.
101. 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. <https://doi.org/10.1007/s12161-010-9155-3>.
102. Durand, N.; Gueule, D.; Fourny, G. Contaminants in coffee. *Cah. Agric.* 2006, 2–3, 192–196.
103. 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. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1868>.
104. 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](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/?tdsourcetag=s_pcqq_aiomsg) pristupljeno: 25.10. 2023.
105. 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.
106. 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. <https://doi.org/10.5614/j.math.fund.sci.2015.47.3.7>

107. 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.
108. Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J. (2012) Heavy Metals Toxicity and the Environment. U: Molecular, Clinical and Environmental Toxicology; Volume 3: Environmental Toxicology (Luch, A., ured.), Springer, Basel, str. 133-164.
109. 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.
110. European Commission, Arsenic, Arsenic in food. [https://food.ec.europa.eu/safety/chemical-safety/contaminants/catalogue/arsenic\\_en](https://food.ec.europa.eu/safety/chemical-safety/contaminants/catalogue/arsenic_en) pristupljeno 15.10.2023.
111. 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128913>.
112. 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. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4002#:~:text=Overall%2C%20the%20CONTAM%20Panel%20concluded,eczematous%20flare%20Dup%20skin%20reactions> pristupljeno 15.10.2023.
113. European Food Safety Authority (EFSA). The 2015 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J.* 2017, 15, 4791. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4791>.
114. 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. *OJL* 2003, 126, 34–39.
115. Ballesteros, L.F., Teixeira, J.A., Mussatto, S.I. (2014) Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food Bioprocess Tech.*, 7, str. 3494-3503.

116. Zarrinbakhsh, N.; Wang, T.; Rodriguez-Uribe, A.; Misra, M.; Mohanty, A.K. Characterization of wastes and coproducts from the coffee industry for composite material production. *BioResources* 2016, 11, 7637–7653.
117. 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.
118. Svensson B, Svendsen IB, Hoejrup P, Roepstroff P, Ludvigsen S, Poulsen Flemming M (1992) Primary structure of barwin: a barley seed protein closely related to the C-terminal domain of proteins encoded by wound-induced plant genes. *Biochemistry*, 31 (37), 8767-8770. doi:10.1021/bi00152a012
119. Nzekoue, F.K., Angeloni, S., Navarini, L., Angeloni, C., Freschi, M., Hrelia, S., Vitali, L.A., Sagratini, G., Vittori, S., Caprioli, G. (2020) 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.* 133, 109128. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109128
120. 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.
121. Međuvladin panel o klimatskim promjenama <https://www.ipcc.ch/> pristupljeno: 25.10. 2023.
122. Landfill of biodegradable waste, production mix, Environmental Footprint, database: openLCA
123. Guglielmetti, A., D'Ignoti, V., Ghirardello, D., Belviso, S., & Zeppa, G. (2017). OPTIMISATION OF ULTRASOUND AND MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION OF CAFFEYOYLQUINIC ACIDS AND CAFFEINE FROM COFFEE SILVERSKIN USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY. *Italian Journal of Food Science*, 29(3). <https://doi.org/10.14674/IJFS-727>
124. Antonetti C.; Ciorba S.; Licursi, D.; Raspolli Galletti A.M. Optimization Study for Extraction of the Value-Added Compounds Polyphenols from the Waste Biomass Coffee Silverskin in the Perspective of Circular Economy. 2021. <https://arpi.unipi.it/handle/11568/1116528>
125. 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, 16281. <https://doi.org/10.3390/su152316281>
126. 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. <https://doi.org/10.3390/molecules27206839>
127. Sánchez, A.; Vázquez, A. (2017) Bioactive peptides: A review, *Food Quality and Safety*, **1**, 29–46, <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx006>
128. Purohit K, Reddy N, Sunna A. Exploring the Potential of Bioactive Peptides: From Natural Sources to Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2024 Jan 23;25(3):1391. doi: 10.3390/ijms25031391
129. Zengin, G., Sinan, K. I., Mahomoodally, M. F., Angeloni, S., Mustafa, A. M., Vittori, S., Maggi, F., Caprioli, G. (2020) Chemical composition, antioxidant and enzyme inhibitory properties of different extracts obtained from spent coffee ground and coffee silverskin. *Foods*. **9**, 713. doi:10.3390/foods9060713
130. Preedy VR, Patel VB (urednici izdanja); *Coffee in Health and Disease Prevention*, 2.izdanje, 2024, Academic Press, London, UK
131. Nieman DC, Gillitt ND, Knab AM, Shanely RA, Pappan KL, Jin F, Lila MA. 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 Aug 15;8(8):e72215. doi: 10.1371/journal.pone.0072215. PMID: 23967286; PMCID: PMC3744465.
132. Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Front Nutr.* **2018** Sep 21;5:87. doi: 10.3389/fnut.2018.00087. PMID: 30298133; PMCID: PMC6160559.
133. Vidinamo, F., Fawzia, S., & Karim, M. A. (2020). Effect of drying methods and storage with agro-ecological conditions on phytochemicals and antioxidant activity of fruits: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(2), 353–361. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1816891>
134. Çakmakçı, S.; Çakmakçı, R. Quality and Nutritional Parameters of Food in Agri-Food Production Systems. *Foods* **2023**, 12, 351. <https://doi.org/10.3390/foods12020351>
135. Zhang C., Guo X., Guo R., Zhu L., Qiu X., Yu X., Chai J., Gu C., Feng Z. *Food Chemistry: X* **2023**, 17. Insights into the effects of extractable phenolic

- compounds and Maillard reaction products on the antioxidant activity of roasted wheat flours with different maturities. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100548>
136. Zhu, B., Hui, T., & Li, X. (2023). Effects of Microwave Heating on Sensory Properties and Antioxidant Activity of Maillard Reaction Products from Enzymatic Hydrolysate of *Acetes chinensis*. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 32(3), 304–320. <https://doi.org/10.1080/10498850.2023.2213696>
137. Herrmann M, Mehner E, Egger L, Portmann R, Hammer L, Nemecek T (2024) A comparative nutritional life cycle assessment of processed and unprocessed soy-based meat and milk alternatives including protein quality adjustment. *Front. Sustain. Food Syst.* 8:1413802. doi: 10.3389/fsufs.2024.1413802



## 8. POPIS KRATICA

- ANOVA – analiza varijanci (engl. *Analysis of variance*)
- 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 silver skin*)
- UAE – Ultrazvučna ekstrakcija (engl. *Ultrasound-assisted extraction*)





## 9. PRILOZI

**PRILOG 1:** Prikaz pesticida analiziranih pomoću GC-MS/MS

	<b>Analit</b>	<b>Vrijeme zadržavanja</b>	<b>Koncentracija (µg/ml)</b>	<b>Iskorištenje</b>
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-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-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-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-BHC	17,95	0,0069±0,0001	0,69±0,01
29	Trialat	18,10	0,0082±0,0002	0,82±0,03
30	Teflutrin	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	Heptahlor	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	Fenitrotion	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	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	o,p'-DDT	27,20	0,0085±0,0005	0,85±0,05
95	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	Cihalofop-butyl	30,94	0,0083±0,0003	0,83±0,03
116	Akrinatriin-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	Akrinatriin-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 pomoću LC-MS/MS (5 s najmanjim i 5 s najvećim vremenom zadržavanja)

	Analit	Vrijeme zadržavanja	Podudaranje matrica	Standard	Iskorištenje
1	Metamidofos	3,52	25814,30±3911,65	21883,07±66 9,89	0,85±0,03
2	Acefat	3,97	19103,94±813,07	15727,00±23 8,56	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±70 4,63	0,82±0,03
5	Butoksikarboksi m	4,42	10950,54±833,65	9728,59±896, 15	0,89±0,08
6	Spirodiklofen	16,00	10361,31±461,09	10301,52±23 2,05	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±32 94,35	0,90±0,04
9	Fenazakvin	16,41	80193,47±99527	72394,18±79 7,29	0,90±0,01
10	Spinetoram	16,51	54974,63±1307,35	53126,81±92 7,55	0,97±0,02

### PRILOG 3: Izvorni znanstveni rad

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>

### PRILOG 4: 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. <https://doi.org/10.3390/su15108198>

## 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 specijalistički studij na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Razvoj lijekova na kojem je 2014. diplomirao s temom „Homeopatski lijekovi“. Potom upisuje doktorski studij na istome fakultetu, smjer Farmaceutske znanosti. Autor je 2 znanstvena rada te nekoliko stručnih, 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.; 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>

**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>

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

Ostali znanstveni i stručni radovi:

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

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