

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Angela Božić

**FUNKCIONALNA SVOJSTVA  
BILJNIH PROTEINA I ASPEKT  
ODRŽIVE PRIMJENE**

Zagreb, 2021.

Ovaj je rad izrađen u Laboratoriju za održivi razvoj, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

# SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1.	PROTEINI.....	2
2.1.1.	Faktori koji utječu na stabilnost proteina .....	3
2.1.1.1.	<i>Temperatura</i> .....	4
2.2.	FUNKCIONALNA SVOJSTVA PROTEINA.....	4
2.2.1.	Topljivost proteina.....	5
2.2.2.	Kapacitet vezanja vode.....	5
2.2.3.	Kapacitet vezanja ulja.....	6
2.2.4.	Svojstva pjenjenja.....	6
2.2.5.	Svojstva emulgiranja .....	6
2.3.	ZETA POTENCIJAL .....	7
2.4.	HIDROFOBNOŠĆ PROTEINA .....	10
2.5.	PROTEINI U NUSPROIZVODIMA IZ PROIZVODNJE HRANE .....	12
2.6.	PROTEINI U PREHRANI .....	13
2.7.	ZAŠTO BILJNI PROTEINI? .....	15
2.8.	BILJNI PROTEINI U KONTEKSTU ODRŽIVOSTI .....	17
2.9.	GRAŠAK.....	18
2.9.1.	Proteini graška.....	19
2.9.2.	Funkcionalna svojstva proteina graška.....	20
2.9.3.	Iskorištenje proteina graška .....	21
2.10.	BOB.....	22
2.10.1.	Proteini boba.....	22
2.10.2.	Funkcionalna svojstva proteina boba .....	23
2.10.3.	Iskorištavanje proteina boba.....	24
2.11.	RIŽA.....	24
2.11.1.	Proteini riže .....	25
2.11.2.	Funkcionalna svojstva proteina riže .....	26
2.11.3.	Iskorištenje proteina riže .....	27
2.12.	KONOPLJA .....	28
2.12.1.	Proteini konoplje .....	29
2.12.2.	Funkcionalna svojstva proteina konoplje .....	30
2.12.3.	Iskorištenje proteina konoplje .....	30
2.13.	SREBRNA POKOŽICA KAVE .....	31
2.13.1.	Proteini srebrne pokožice kave.....	32
2.13.2.	Funkcionalna svojstva pokožice kave .....	32
2.13.3.	Iskorištenje srebrne pokožice kave.....	32
2.14.	SIRUTKA.....	33
2.14.1.	Proteini sirutke .....	33
2.14.2.	Funkcionalna svojstva proteina sirutke .....	35
2.14.3.	Iskorištenje proteina sirutke .....	35
2.15.	ODRŽIVOST I HRANA NA BAZI PROTEINA IZ BILJNOG IZVORA.....	36
<b>3.</b>	<b>MATERIJALI I METODE</b> .....	42
3.1.	MATERIJALI .....	42
3.1.1.	Pribor i aparatura .....	42
3.1.2.	Kemikalije .....	43
3.1.3.	Uzorci .....	43
3.2.	METODE .....	45
3.2.1.	Određivanje ukupnih proteina metodom po Lowryju .....	45
3.2.2.	Određivanje veličine čestica.....	45
3.2.3.	Određivanje molekularne mase .....	46

3.2.4.	Određivanje svojstava pjenjenja proteina .....	46
3.2.5.	Određivanje svojstava emulgiranja proteina .....	47
3.2.6.	Određivanje kapaciteta vezanja vode i ulja .....	48
3.2.7.	Određivanje zeta potencijala .....	48
3.2.8.	Određivanje površinske hidrofobnosti proteina .....	49
3.2.9.	Statistička analiza podataka.....	51
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>52</b>
4.1.	Količina proteina .....	52
4.2.	Veličina čestica.....	53
4.3.	Molekularna masa .....	53
4.4.	Svojstva pjenjenja.....	54
4.5.	Svojstva emulgiranja .....	55
4.6.	Sposobnost vezanja vode i ulja.....	56
4.7.	Zeta potencijal .....	56
4.8.	Površinska hidrofobnost proteina .....	58
4.9.	Statistička analiza podataka.....	62
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA</b> .....	<b>65</b>
5.1.	Količina proteina .....	65
5.2.	Veličina čestica.....	65
5.3.	Molekularna masa .....	67
5.4.	Svojstva pjenjenja.....	68
5.5.	Svojstva emulgiranja .....	69
5.6.	Sposobnost vezanja vode i ulja.....	71
5.7.	Zeta potencijal .....	72
5.8.	Površinska hidrofobnost proteina .....	74
5.9.	Statistička analiza podataka.....	76
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>ZAHVALA</b> .....	<b>79</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>80</b>
	<b>SAŽETAK</b> .....	<b>90</b>
	<b>SUMMARY</b> .....	<b>91</b>

# 1. UVOD

Iz dana u dan povećava se konzumacija mesa i mesnih proizvoda što ima snažan utjecaj na okoliš i ljudsko zdravlje, stoga se prehrambena industrija okreće održivoj proizvodnji, na način da ispituje nove i održivije načine proizvodnje te nastoji proizvod iskoristiti u cijelosti ne zanemarujući njegove nusproizvode proizvodnje. Nastoje se pronaći alternative mesu, kako bi se smanjio negativan pritisak na okoliš, a ujedno kako bi se iskoristile sve blagodati biljnog svijeta. Biljke su se u mnogočemu pokazale iznimno korisne namirnice i odličan izvor mikro i makromolekula kao što su antioksidansi, minerali, vlakna pa i proteini. Proteini su molekule od velike važnosti za čovjeka zbog značajne uloge koju imaju u organizmu i jer sudjeluju u gotovo svakom biološkom procesu. Osim što sudjeluju u biološkim procesima, imaju važnu ulogu u prehrani čovjeka te su vrlo zanimljivi u prehrambenoj industriji zbog svojih funkcionalnih svojstava. Jedan od rješenja problema održivosti proizvodnje proteina mogao bi biti prelazak na prehranu na bazi biljnih proteina. Iako se proteini životinjskog porijekla promoviraju kao kvalitetniji od biljnih proteina zbog visoke probavljivosti, sastava aminokiselina i bolje topljivosti u vodi, probavljivost i raznolikost aminokiselina može se nadoknaditi kombinacijom biljnih proteina iz različitih izvora. Ono što se smatra većim problemom jest naviknuti ljude na biljnu prehranu s obzirom na to da ljudi nerado zamjenjuju životinjske namirnice biljnim (Karwacka i sur., 2020; Balandra'n-Quintana, 2019) .

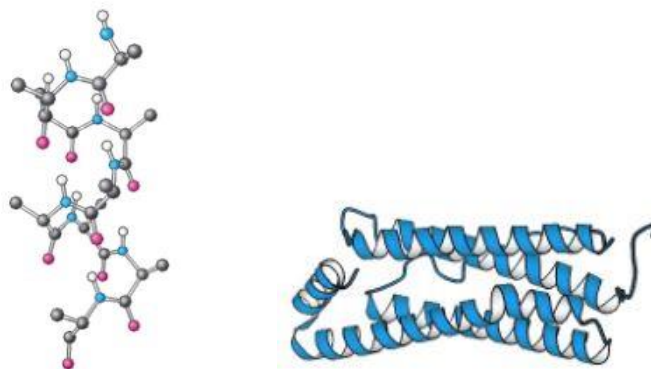
Kako bi očuvali naš okoliš i napravili veliki korak prema održivoj proizvodnji hrane, cilj je životinjske proizvode u što većoj količini zamijeniti biljnim proizvodima koji će nutritivno biti jednako bogati, a zahvaljujući novim tehnologijama i novom pristupu hrani mogu biti nutritivno puno bogatiji i izgledom atraktivniji od samih životinjskih proizvoda. Glavni cilj suvremenih istraživanja je pronaći optimalnu biljnu sirovinu koja će svojim nutritivnim sastavom i funkcionalnim svojstvima udovoljavati uvjetima za proizvodnju hrane na biljnoj bazi, a koja će ujedno privući potrošače svojim senzorskim svojstvima (Sha i Xiong, 2020).

U ovom radu provedene su analize na pet različitih biljnih proteina te na jednoj vrsti životinjskih proteina s ciljem utvrđivanja funkcionalnih svojstava tih proteina, njihove stabilnosti u obliku suspenzije te s ciljem usporedbe svojstava biljnih proteina sa svojstvima jednog od najčešće korištenih životinjskih proteina u prehrambenoj industriji. Određivanjem navedenih svojstava nastoji se utvrditi mogućnost iskorištavanja biljnih proteina u budućim prehrambenim proizvodima.

## 2. TEORIJSKI DIO

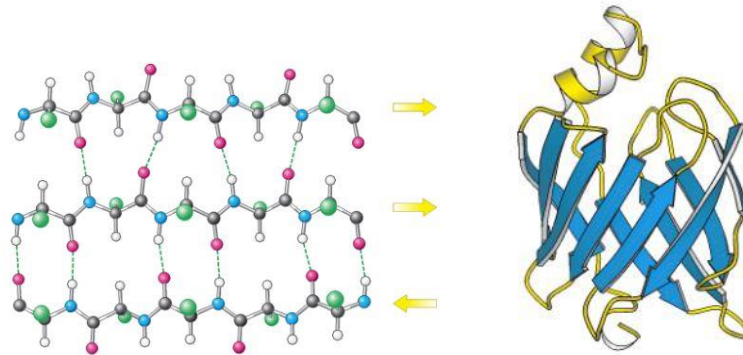
### 2.1. PROTEINI

Proteini ili bjelančevine su najsvestranije makromolekule u živim sustavima, predstavljaju glavni građevni materijal organizma i imaju funkciju u gotovo svim biološkim procesima. Djeluju kao katalizatori, transportiraju i pohranjuju druge molekule kao što su kisik, pružaju mehaničku potporu i imunološku zaštitu, generiraju pokret, prenose živčane impulse i kontroliraju rast i diferencijaciju. Proteini su linearni polimeri izgrađeni od monomera koji se nazivaju aminokiseline. Aminokiseline su glavne gradivne jedinice proteina koje su međusobno povezane peptidnom vezom i na taj način tvore linearni polimer. Svi prirodni proteini složeni su od samo 20 različitih aminokiselina. Glavna razlika ovih 20 aminokiselina su bočni lanci koji se razlikuju po veličini, obliku i prisutnosti funkcionalnih skupina. Po svom kemijskom sastavu proteini sadrže ugljik, vodik, kisik i dušik, a mnoge i sumpor i fosfor, te željezo, jod, bakar i cink, a ovisno o vrsti povezanih aminokiselina, molekule proteina tvore enzime, hormone, protutijela, mišiće, organe i mnoga druga tkiva u organizmu. Funkcija određenog proteina direktno je povezana s njegovom trodimenzionalnom građom u koju se slažu spontano prilikom njihovog nastanka, odnosno prilikom slaganja aminokiselina u proteinski polimer prethodno određenim redoslijedom zapisanim u molekuli DNA (deoksiribonukleinska kiselina). Proteini imaju četiri glavne strukture primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvartarnu. Primarnu strukturu čini linearni polimerni lanac formiran povezivanjem aminokiselina peptidnim vezama. Sekundarnu strukturu čine  $\alpha$ -uzvojnica i  $\beta$ -nabrana ploča te petlje i zavoji.  $\alpha$ -uzvojnica nastaje stvaranjem jakih vodikovih veza između NH i CO grupa glavnog lanca aminokiseline koje tvore čvrstu spiralnu uzvojnica (Slika 1) (Berg i sur., 2019; Haque i sur., 2016.)



**Slika 1.** Shematski prikaz  $\alpha$ -uzvojnice (lijevo) te prikaz  $\alpha$ -uzvojnice u proteinu (desno) (Berg i sur., 2019)

$\beta$ -nabrana ploča s druge strane, ima potpuno drugačiju građu od  $\alpha$ -uzvojnice.  $\beta$ -nabrana ploča ima opušteniju građu i nije snažno vezana kao  $\alpha$ -uzvojnica. Tvori se tako da se  $\beta$ -lanci međusobno povežu vodikovim vezama tvoreći ploču (Slika 2).  $\beta$ -lanci mogu biti povezani tako da se lanci pružaju u istom smjeru (paralelna  $\beta$ -ploča) ili se mogu povezati pružajući se u suprotnim smjerovima (antiparalelna  $\beta$ -ploča) (Berg i sur., 2019).



**Slika 2.** Shematski prikaz mišesane  $\beta$ -nabrane ploče (lijevo) te prikaz  $\beta$ -nabrane ploče unutar proteina (desno) (Berg i sur., 2019)

Kada se formira sekundarna struktura započinje stvaranje tercijarne strukture koja poprima globularni oblik. Općenito, proteini imaju tendenciju da u vodenim otopinama "sakrivaju" nepolarne hidrofobne ostatke te stvaraju globularnu strukturu tako da hidrofobni ostaci ostaju unutar globularne strukture gdje su sakriveni od vode, a to je potaknuto hidrofobnim interakcijama. Stoga, hidrofilni ostaci ostaju na površini globularne, tercijarne strukture, u kontaktu s vodom (Søbye i sur., 2015). Kvartarna struktura nastaje povezivanjem više polipeptidnih lanaca. Proteini mogu sadržavati velik broj funkcionalnih grupa kao što su alkoholi, tioli, tioeteri, karboksilna kiselina i mnoge druge, a te funkcionalne grupe omogućavaju proteinu širok spektar funkcija. Proteini mogu reagirati međusobno, ali i s mnogim drugim biološkim makromolekulama u svrhu stvaranje novih sposobnosti koje ne pruža pojedinačna molekula. Neki proteini imaju vrlo krutu građu i takvi proteini uglavnom služe kao gradivni proteini, dok su neki proteini fleksibilni. Većina prirodnih polipeptidnih lanaca sadrži između 50 do 2000 aminokiselinskih ostataka i kao takvi se nazivaju proteinom. Srednja molekularna masa jedne aminokiseline je 110 Da, pa stoga, molekularna masa većine proteina se kreće između 5500 i 220 000 Da (Berg i sur., 2019).

#### 2.1.1. Faktori koji utječu na stabilnost proteina

Struktura proteina može se promijeniti ukoliko se na protein utječe raznim okolišnim faktorima kao što su temperatura, pH, denaturirajući agensi, visoke koncentracije soli, detergentsi, jako

mehaničko djelovanje i drugi. U situacijama kada se na proteine djeluje jednim od navedenih faktora, može doći do gubitka tercijarne i sekundarne strukture proteina, što je posljedica pucanja veza koje su odgovorne za stvaranje istih, što se naziva denaturacijom proteina (Berg i sur., 2019).

#### *2.1.1.1. Temperatura*

Mnogi procesi u prehrambenoj industriji zahtijevaju primjenu visokih i/ili niskih temperatura što može dovesti do denaturacije proteina. Većina proteina uglavnom denaturira na visokim temperaturama, ali postoje i proteini kojima štete i niske temperature. Proteinske strukture su vrlo osjetljive na promjene temperature, jer je njihova energija stabilizacije vrlo niska. Proteini pokazuju velike razlike u svojoj toplinskoj stabilnosti. Na primjer, većina enzima je nestabilna čak i na 45°C što je samo nekoliko stupnjeva iznad fiziološke temperature na kojoj optimalno funkcioniraju. S druge strane, postoje i proteini poput alkalne fosfataze koji su stabilni na visokim temperaturama. Neenzimski proteini, posebno proteini koje pronalazimo u hrani kao što su proteini sirutke i mahunarki, obično su stabilni na temperaturama i do 70-80°C. Mehanizam denaturacije proteina temperaturom uključuje utjecaj temperature prvenstveno na stabilnost nekovalentnih interakcija, kao što su vodikove veze i elektrostatske interakcije (Sajib i sur., 2020).

Denaturacija uzrokovana temperaturom ima utjecaj i na funkcionalna svojstva kao što su topljivost, emulzijski kapacitet, geliranje, pjenjenje. Ukoliko se koriste umjerene temperature denaturacija može biti reverzibilna, no ukoliko su temperature visoke, proces denaturacije će biti ireverzibilan. U slučaju da se termičkim postupkom enzimi ne denaturiraju u potpunosti, odnosno ireverzibilno, može doći do ponovnog smatanja i stvaranja prirodne strukture te povratka funkcija, što potencijalno može uzrokovati probleme s kvalitetom prehrambenih proizvoda tijekom skladištenja (Xiong i sur., 2020).

## **2.2. FUNKCIONALNA SVOJSTVA PROTEINA**

Funkcionalno svojstvo proteina, u širem smislu, označava bilo koje fizikalno-kemijsko svojstvo koje utječe na obradu i ponašanje proteina u prehrambenim sustavima, te na kvalitetu završnog proizvoda. Primjeri funkcionalnosti bjelančevina uključuju topljivost, emulgiranje, geliranje i pjenjenje. Oni odražavaju složene interakcije između sastava, strukture, konformacije, fizikalno-kemijskih svojstava samih bjelančevina te ostalih sastojaka hrane i okoline u kojoj se nalaze (Haque i sur., 2016).



Ta svojstva značajno ovise o izvoru iz kojega se proteini izoliraju, metodi izolacije, taloženja, sušenja/dehidracije, njihovoj koncentraciji te vanjskim uvjetima osobito temperaturi, pH vrijednosti i ionskoj snazi. Funkcionalna svojstva proteina mogu ovisiti i o prisutnosti drugih molekula u hrani (ugljikohidrati, lipidi) te njihovim međusobnim interakcijama. Proteini u hrani uglavnom se sastoje od nekoliko odvojenih proteina te svaki ima svoja specifična svojstva. Zbog toga se funkcionalna svojstva proteina ne moraju odražavati kao svojstva svih proteina, nego pojedinih komponenata (Sikorski, 2019). Funkcionalna svojstva rezultat su fizikalno-kemijskih pojava koje se javljaju tijekom skladištenja, prerade i potrošnje sastojaka ili prehrambenih proizvoda. Na njih uglavnom utječu svojstva bjelančevina: njihova hidratacija u tekućinama, njihova površinska aktivnost (hidrofobnost i raspodjela naboja) i njihova struktura (primarna, sekundarna, tercijarna i kvartarna), sve to skupa pridonosi topljivosti, vlažnosti, agregaciji, međufaznoj adsorpciji u koloidima (pjene i emulzije), reološkim karakteristikama (viskoznost, elastičnost, ljepljivost i geliranje) (Sharan i sur., 2020).

### 2.2.1. Topljivost proteina

Topljivost proteina predstavlja jedno od najvažnijih funkcionalnih svojstava s obzirom na to da proteini moraju biti topljivi kako bi bili primjenjivi u hrani. Topljivost proteina je ovisna o pH vrijednosti, a minimalna je kod izoelektrične točke (pI). Važnost topljivosti proteina može se vidjeti u činjenici da utječu na sposobnost stvaranja pjene, emulgirajuća svojstva, povećanja viskoznosti, svojstva želiranja i druga. Dakle, velik broj funkcionalnih svojstava ovisi o topljivosti proteina. Topljivost proteina smanjuje se denaturacijom proteina, zbog promjena na njihovoj sekundarnoj i tercijarnoj strukturi zbog čega hidrofobni ostatci proteina izlaze na njegovu površinu te mu se i hidrofilnost smanjuje (Vihinen, 2020).

### 2.2.2. Kapacitet vezanja vode

Kapacitet vezanja vode (*eng. water holding capacity*, WHC) ili sposobnost vezanja vode proteina određuje se tako da se mjeri količina vode koja je zaostala u uzorku nakon što se uzorak promiješao s vodom, centrifugirao i nakon što se ostatak vode dekantirao (Ge i sur., 2020). Proteinski sastojci s vrlo visokim WHC mogu dehidrirati ostale sastojke u prehrambenom sustavu, dok proteini s malim WHC mogu biti osjetljiviji na vlagu prilikom skladištenja. Stoga je odabir proteina s odgovarajućim WHC presudan u formulaciji hrane. Razni unutarnji, vanjski i okolišni čimbenici kao što su pH, ionska snaga i temperatura utječu na WHC proteina. Najniža sposobnost vezanja vode kod proteina zabilježena je na pI gdje je neto naboj proteina jednak nuli, a mijenjanjem pH otopine proteina mijenjaju se i naboji na ioniziranim skupinama što dovodi do mijenjanja konformacije proteina te izlaganja ili sakrivanja grupa na proteinu koje

moгу vezati vodu (Haque, 2016). Visoki kapacitet vezanja vode kod proteina je potreban, na primjer, kod pekarskih i sličnih proizvoda kako bi ostali svježi i kako ne bi došlo do gubitka vlage i njihovog brzog isušivanja te kako bi raznim prehrambenim proizvodima mogli dati željenu teksturu (Amagliani i sur., 2017).

### 2.2.3. Kapacitet vezanja ulja

Kapacitet vezanja ulja (*eng. oil holding capacity, OHC*) proteina važan je za poboljšanje osjećaja i zadržavanja okusa u ustima određenih prehrambenih proizvoda (Khan i sur., 2011). Vezanje masti u matrici hrane utječe na teksturu i druga senzorska svojstva hrane. Stoga je važno da proteini imaju sposobnost apsorbiranja i zadržavanja masnoće i stvaranja interakcija s njima u emulzijama i drugim prehrambenim sustavima. Na proteinsku sposobnost vezanja masti, odnosno ulja utječe vrsta proteina, uvjeti obrade, sastav aminokiselina, veličina čestica masti ili kapljica ulja i temperatura. Proteinski prah s niskom gustoćom i malom veličinom čestica adsorbira i veže više ulja nego proteinski prah visoke gustoće (Haque i sur., 2016).

### 2.2.4. Svojstva pjenjenja

Svojstva pjenjenja ovise o sposobnosti proteina da se brzo adsorbiraju na granici zrak-voda, o brzini konformacijskih promjena na granici zrak-voda i o stvaranju kohezivnog viskoelastičnog filma na prijelazu faza pomoću intermolekularnih interakcija. Kapacitet pjenjenja opisuje količinu međufazne površine koju proteini mogu stabilizirati po jedinici mase ili koncentracije, a povezan je s visokom molekularnom fleksibilnošću, gustoćom naboja i hidrofobnošću. Isto tako, reološka svojstva, kao što su viskoznost i otpornost smicanju, elastičnost filma i tlak između proteinskih slojeva, utječu na stabilnost pjene. Stabilnost pjene odnosi se na sposobnost proteina da stabiliziraju i očuvaju pjenu od gravitacijskih i mehaničkih naprezanja (Amagliani i sur., 2017). Sposobnost pjenjenja proteinskih materijala općenito se mjeri maksimalnim povećanjem volumena postignutim disperzijom proteina nakon ugradnje zraka. Stabilnost pjene je sposobnost pjene da zadržava volumen tijekom vremena i obično se mjeri brzinom istjecanja tekućine iz pjene (Ge i sur., 2020).

### 2.2.5. Svojstva emulgiranja

Svojstva emulgiranja proteina odnose se na sposobnost stabilizacije emulzija ulja i vode. Kako bi ispitali svojstva emulgiranja proteina, ispituju se svojstva emulzijskog kapaciteta, stabilnost emulzije i aktivnost emulzije. Kapacitet emulgiranja definira se kao količina (volumen) ulja koja se može emulgirati standardnom težinom proteina prije nego što emulzija propadne. Stabilnost i aktivnost emulzije odnose se na sposobnost proteina da stvore emulziju čija se svojstva neće promijeniti određeno vrijeme pod određenim uvjetima (Iyer i sur., 2015). Na

svojstva emulgiranja utječu čimbenici slični onima koji utječu na svojstva pjenjenja, uključujući brzinu adsorpcije proteina na granici ulje-voda, količinu adsorbiranih proteina, konformacijsko preslagivanje proteina na granici ulje-voda, smanjenje međufazne napetosti i stvaranje kohezivnog sloja. Kapacitet emulgiranja proteina direktno ovisi o topljivosti, tako da svi činitelji koji smanjuju topljivost utječu na snižavanje kapaciteta emulgiranja (Amagliani i sur., 2017).

### 2.3. ZETA POTENCIJAL

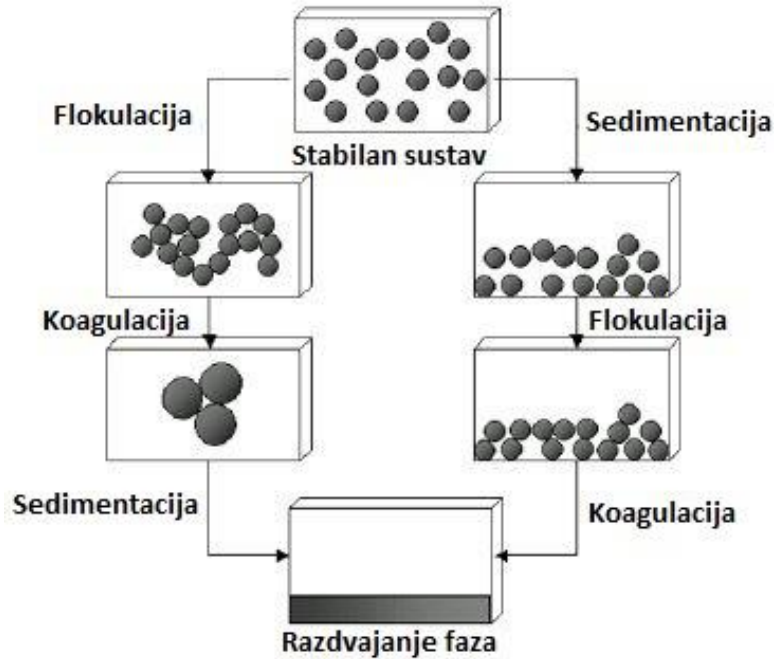
Zeta potencijal je fizikalno svojstvo koje sadrži svaka čestica u suspenziji, makromolekula ili površina materijala. Može se koristiti za optimizaciju formulacija suspenzija, emulzija i otopina proteina, za predviđanje interakcija s raznim površinama i optimiziranje filmova i prevlaka. Poznavanje zeta potencijala može smanjiti vrijeme potrebno za izradu pokusnih formulacija, a također se može koristiti kao pomoć u predviđanju dugoročne stabilnosti (Malvern Instruments Limited, 2015). Mnoga važna svojstva koloidnih sustava određuju se izravno ili neizravno električnim nabojem (ili potencijalom) na česticama. Adsorpcija iona i bipolarnih molekula određena je raspodjelom naboja i potencijala. Raspodjela potencijala određuje interakcijsku energiju između čestica te je u većini slučajeva odgovorna za stabilnost čestica prema koagulaciji i za mnoge aspekte ponašanja protoka koloidne suspenzija. Zeta potencijal se također može povezati sa sedimentacijskim ponašanjem koloidnih sustava i flotacijskim ponašanjem mineralnih ruda. Zeta-potencijal koristi se u koloidnoj kemiji za promatranje ponašanja disperzivnih sustava u tekućinama, a karakterizira ga dvostruki električni sloj na granici čvrsto-tekuće (Wei Lu i Gao, 2010).

Zeta potencijal mjeri se elektroforetskim raspršivanjem svjetlosti, što podrazumijeva primjenu električnog polja na uzorak. Česta nuspojava ove mjerne tehnike je takozvano Joule-ovo zagrijavanje, gdje električna struja prolazi kroz vodič (u ovom slučaju uzorak) i proizvodi toplinu. Što je veća vodljivost uzorka, to će se stvoriti više topline, što potencijalno može dovesti do degradacije uzorka i oštećenja elektroda. Problem je posebno izražen za biološke uzorke koji imaju dvostruki nedostatak, taj što zahtijevaju otapala visoke vodljivosti te su vrlo osjetljivi na razgradnju toplinom. Stoga je za takve uzorke presudno da se električna struja održava što je moguće nižom i da se primjenjuje najkraće moguće vrijeme. U Litesizer™ 500 Antona Paara, patentirana cmPALS tehnologija omogućuje stabilna i osjetljiva mjerenja zeta

potencijala pri nižim naponima, kao i kraća vremena mjerenja, što smanjuje negativan utjecaj na osjetljivi uzorak (Burgstaller i Etchart, 2021).

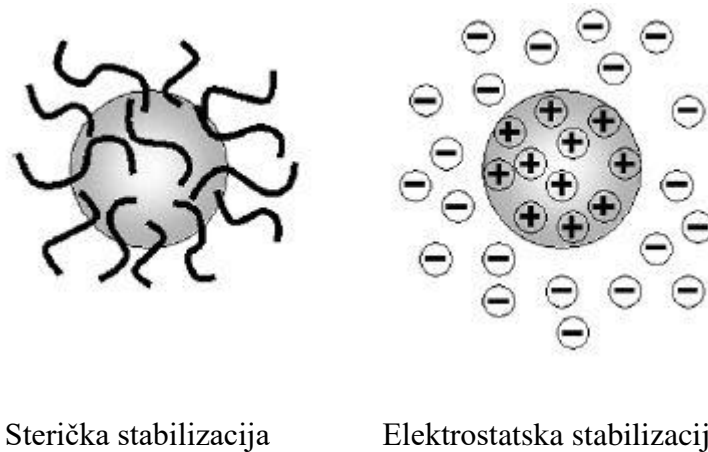
Velika pozitivna ili negativna vrijednost zeta potencijala ukazuje na dobru fizičku stabilnost suspenzija uslijed elektrostatičkog odbijanja pojedinih čestica. Vrijednost zeta potencijala koja nije između vrijednosti  $-30$  mV do  $+30$  mV obično se smatra dovoljnom odbojnom silom za postizanje bolje fizičke koloidne stabilnosti. S druge strane, mala vrijednost zeta potencijala može rezultirati agregacijom i flokulacijom čestica zbog van der Waalsovih privlačnih sila koje djeluju na njih. To može rezultirati fizičkom nestabilnošću i takve se suspenzije smatraju nestabilnima. Najvažniji čimbenik koji utječe na zeta potencijal je pH vrijednost medija. Ostali čimbenici uključuju ionsku snagu, koncentraciju bilo kakvih dodataka i temperaturu (Joseph i Singhvi, 2019).

U određenim okolnostima, čestice u disperziji mogu se lijepiti jedna za drugu i stvarati agregate čija veličina postepeno raste i koji se mogu taložiti pod utjecajem gravitacije (Slika 3). Inicijalno nastali agregat naziva se flok, a proces njegovog formiranja flokulacija. Flok se može ili ne mora taložiti ili fazno odvajati. Ako se agregat promijeni u puno gušći oblik, kaže se da prolazi kroz koagulaciju. Pojmovi flokulacija i koagulacija često se koriste kao sinonimi, no koagulacija je obično nepovratna, dok se flokulacija može biti reverzibilna, a suprotan postupak je deflokulacija (Malvern Instruments Limited, 2015).



**Slika 3.** Shematski prikaz različitih procesa u kojima se gubi stabilnost koloidne disperzije (Malvern Instruments Limited, 2015)

Da bi se održala stabilnost koloidnog sustava, odbojne sile moraju biti dominantne, a dva su temeljna mehanizma koja utječu na stabilnost disperzije (Slika 4).



**Slika 4.** Sterički i elektrostatski stabilizacijski mehanizam koloidne suspenzije (Malvern Instruments Limited, 2015)

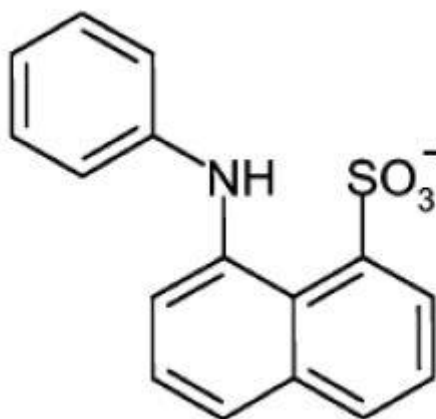
Sterička odbojnost uključuje polimere koji se dodaju u sustav te se adsorbiraju na površinu čestica i sprječavaju da čestice dolaze u bliski kontakt. Ako se dovoljno polimera adsorbira, debljina vanjskog sloja bit će dovoljna da zadrži čestice razdvojene steričkim odbijanjem između slojeva, a u tom slučaju su van der Waalove sile preslabe da bi se čestice međusobno spojile. S druge strane, elektrostatska stabilizacija, odnosno stabilizacija potpomognuta

nabojem, utječe na interakciju između čestica zbog raspodjele iona na površini čestice (Malvern Instruments Limited, 2015).

#### 2.4. HIDROFOBNOST PROTEINA

Mnoge nepolarne aminokiseline se povezuju hidrofobnim interakcijama koje su specifične u odnosu na druge vrste veza. Hidrofobne interakcije se ne definiraju jednako kao privlačna sila između atoma ili molekula. Molekula vode i hidrofilne, odnosno, polarne molekule imaju određenu polarnost, a ta polarnost unutar molekula privlači ili odbija druge molekule. S druge strane, hidrofobne molekule kao što su aminokiseline nemaju silu koja privlači ili odbija druge molekule. U takvim se molekulama odvija proces u kojem polarne molekule okružuju nepolarne molekule pa dolazi do agregacije nepolarnih molekula unutar molekula vode ili nekih drugih polarnih molekula. S obzirom na to da se sve biološke molekule nalaze i obavljaju funkcije u vodi ili okolini koja sadrži vodu, temelj povezivanja biomolekula postalo je upravo izbjegavanje polarne okoline, odnosno hidrofobna agregacija. Hidrofobne interakcije unutar proteina su jako slabe u usporedbi s ostalim molekularnim vezama. No, većina proteina stvara hidrofobnu jezgru kako bi se mogli smotati u točno određenu konformaciju ili kako bi stvorili hidrofobni "put" kojim bi se povezali s drugim proteinima. Enzimi ili neki transportni proteini u većini slučajeva koriste hidrofobne regije za vezanje i prijenos supstrata (Lee, 2010).

Površinska hidrofobnost proteina može se odrediti pomoću molekule 1-anilinonaftalen-8-sulfonat (ANS) koji daje određeni fluorescentni intenzitet kada se veže za hidrofobnu skupinu proteina.

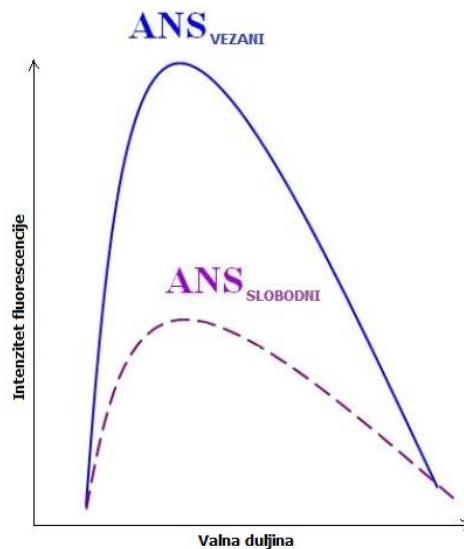


**Slika 5.** Kemijska struktura 1-anilinonaftalen-8-sulfonata (ANS) (Lee, 2010)

Kemijska struktura ANS-a prikazana je na Slici 5, a sadrži naftalen i anilinski prsten koji su hidrofobni, ali sadrži i sulfonatnu skupinu koja je negativno nabijena. Osim toga, dušik koji povezuje naftalen i anilinski prsten može poslužiti kao donor elektrona pri formiranju vodikove veze s proteinom. Stoga, ANS ima i polarne i hidrofobne dijelove. Sa sulfonatnom skupinom se može povezati s pozitivno nabijenom aminokiselinom, dok se s hidrofobnim dijelovima može povezati s hidrofobnim dijelovima proteina. Komplementarno vezanje i polarnih i nepolarnih grupa je ključna komponenta vezanja ANS-a i proteina (Lee, 2010).

Pravilno posložen i konfiguriran protein nastoji sakriti hidrofobne skupine unutar svoje konformacije, izostavljajući mjesta za vezanje liganda, stoga je gotovo cijela površina proteina hidrofilna, odnosno građena je od polarnih aminokiselina. Kada su proteini podvrgnuti procesu denaturacije neki od hidrofobnih ostataka mogu izaći na površinu. Postavlja se pitanje, kako u tom slučaju prepoznati kada je protein u potpunosti denaturiran, a kada se nalazi u obliku kada su mu samo neke hidrofobne skupine izbile na površinu. U tu svrhu nam pomaže molekula ANS, jer je prilikom vezanja ANS-a za protein potrebno vezanje i nabijene sulfonatne skupine s pozitivno nabijenim aminokiselinama i povezivanje hidrofobnim interakcijama. U slučaju kada je protein u potpunosti denaturiran on nema organiziranu strukturu koja ima i nabijeno područje i hidrofobno područje. Tada ANS stvara nestabilnu vezu s proteinom, a ta nestabilna veza je ili samo s nabijenom skupinom ili samo hidrofobnim interakcijama (Lee, 2010).

ANS je građen od anilina i naftalena koji sadrže aromatske prstene, a aromatski prsteni su fluorescentni zbog prijenosa energije elektrona. Valna duljina ekscitacije za ANS iznosi 350 do 380 nm, a valna duljina maksimalne emisije ANS-a u vodi je 500 nm. No, kada se ANS veže za hidrofobna mjesta na proteinima, maksimum emisije se znatno povećava (Slika 6).



**Slika 6.** Fluorescentni spektar vezanog i slobodnog ANS-a (Lee, 2010).

Intenzivna fluorescencija prikazana plavom linijom koja prikazuje ANS vezan za protein lako se razlikuje od emisijskog signala slobodnog ANS-a, pa mjerenje fluorescencije može biti dobar pokazatelj konfiguracije proteina i njegove denaturacije. Ukoliko na površini proteina imamo više hidrofobnih grupa na koje se ANS može vezati i intenzitet fluorescencije će biti veći.

## 2.5. PROTEINI U NUSPROIZVODIMA IZ PROIZVODNJE HRANE

Otpadni materijal koji se stvara tijekom poljoprivredne proizvodnje, kao što su nejestivi dijelovi biljke ili dijelovi koji u tom trenutku nisu iskoristivi, uklanjaju se tijekom berbe i obrade proizvoda. Razni takvi nusproizvodi imaju visoke razine proteina, ugljikohidrata i vlakana, a na žalost svrstava ih se u otpad ili se u najboljem slučaju koriste kao hrana za životinje ili kao sastojci stočne hrane (Hicks i Verbeek, 2016). Prerada voća, povrća i uljarica rezultira velikom količinom otpadnih materijala kao što su kore, sjemenke, koštice i ostaci od uljanih sjemenki. Zbrinjavanje ovih materijala obično predstavlja problem koji se dodatno otežava zakonskim ograničenjima. Biljni otpad je sklon mikrobiološkom kvarenju pa se u većini slučajeva biljni nusproizvod suši prije daljnjeg iskorištavanja. Troškovi sušenja, skladištenja i transporta su dodatan trošak koji predstavlja ograničenje u iskorištavanju otpada pa se često otpad iz poljoprivredne industrije koristi kao stočna hrana ili gnojivo. No, na taj način se gube vrijedne hranjive tvari sadržane u agroindustrijskom otpadu pa se danas otvaraju novi pogledi za iskorištavanje takve vrste otpada u proizvodnji aditiva za hranu ili dodataka prehrani s visokom hranjivom vrijednošću. S obzirom na to da se radi o proizvodima velike prehranske pa i



ekonomske vrijednosti, sve je veći interes za iskorištavanjem takvih nutritivno bogatih nusproizvoda (Oreopoulou i Tzia, 2007). Nutritivno bogati nusproizvodi koji se danas najčešće iskorištavaju u obliku stočne hrane su žitarice, poput kukuruza, ječma, zobi i pšenice. Soja i njeni nusproizvodi nakon proizvodnje ulja su bogati izvor proteina. U Ujedinjenom Kraljevstvu se sojini nusprodukti koriste u prehrani stoke, pa stočnu prehranu čine dvije trećine proteini. Osim u proteinima neki nusproizvodi proizvodnje ulja bogati su vlaknima. Osim velike količine biljnih produkata i životinjski nusprodukti predstavljaju bogati izvor proteina, a mogu se pronaći u gotovo svakoj mesnoj i ribljoj industriji. Proteinima bogati nusproizvodi, odnosno općenito nutritivno bogati proizvodi koji se danas ne iskorištavaju već spadaju u otpad, trebali bi se iskoristiti u proizvodnji novih prehrambenih proizvoda (Hicks i Verbeek, 2016).

Industrija kave ima velike količine nusproizvoda, pokožice kave, koja je nutritivno bogata proteinima, vlaknima, polifenolnim i sličnim spojevima. Mliječna industrija i proizvodnja sira kao glavni nusproizvod sadrže sirutku, koja je odličan izvor proteina. Sirutku, na sreću već danas možemo pronaći na tržištu u raznim oblicima. Nusproizvodi voća, npr. sjemena jabuke i citrusa, bogati su proteinima, s druge strane koštice marelica i breskvi, također su bogat izvor proteina, a prilikom proizvodnje umaka od rajčice također zaostaje nusproizvod bogat proteinima (Oreopoulou i Tzia, 2007).

## 2.6. PROTEINI U PREHRANI

Višak bjelančevina ljudski organizam ne može pohraniti kao bjelančevine nego one sagorijevaju i pretvaraju se u energiju ili pohranjuju u obliku glikogena ili masti, pa ih je potrebno unositi u organizam svakodnevno. Mnogi mikroorganizmi kao što je *Escherichia coli* mogu sintetizirati svih 20 aminokiselina, dok ljudski organizam ne može sintetizirati 9 aminokiselina. Zbog toga se aminokiseline dijele na neesencijalne i esencijalne. Neesencijalne aminokiseline organizam može sam proizvesti, dok esencijalne aminokiseline organizam ne može sintetizirati pa ih organizam mora dobiti putem hrane. Čovjek putem hrane u organizam mora unijeti 9 aminokiselina, a u Tablici 1. prikazan je popis svih esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina (Borić i Ivankić, 2015).

**Tablica 1.** Prikaz esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina

<b>Neesencijalne aminokiseline</b>	<b>Esencijalne aminokiseline</b>
Alanin	Histidin
Arginin	Izoleucin
Asparagin	Leucin
Aspartat	Lizin
Cistein	Metionin
Glutamat	Fenilalanin
Glutamin	Treonin
Glicin	Triptofan
Prolin	Valin
Serin	
Tirozin	

Proteini potječu iz biljnih i životinjskih izvora. Hrana životinjskog podrijetla sadrži sve esencijalne aminokiseline pa se takve bjelančevine nazivaju potpunim (kompletnim) bjelančevinama ili kvalitetnim visokovrijednim bjelančevinama. One se nalaze u mesu, jajima i mliječnim proizvodima. Premda hrana biljnog podrijetla sadrži mnoge aminokiseline, niti jedan biljni izvor ne sadrži sve esencijalne aminokiseline, pa se takve bjelančevine nazivaju nepotpunim ili nekompletnim bjelančevinama. Ova vrsta bjelančevina nalazi se u mahunarkama, žitaricama, orašastim plodovima, sjemenkama i proizvodima od soje. Sve esencijalne aminokiseline se iz biljnog izvora mogu dobiti kombinacijom biljne hrane. Dnevne preporuke za konzumaciju proteina se kreću od 50 g na dan do oko 1 g bjelančevina po kilogramu tjelesne težine. Način života, odnosno aktivnost pojedinca ima velik utjecaj na potreban dnevni unos proteina. Intenzivno i redovno vježbanje zahtjeva veći dnevni unos proteina. Dnevni unos proteina treba se rasporediti u više obroka, s obzirom na to da organizam nije u mogućnosti odjednom iskoristiti veliku količinu proteina, a u obrocima je potrebno kombinirati i biljne i životinjske izvore proteina (Borić i Ivankić, 2015).

## 2.7. ZAŠTO BILJNI PROTEINI?

Proteini u hrani jedni su od najvažnijih sastojaka u prehrani ljudi s obzirom na njihov prehrambeni doprinos i druge specifične funkcije. U zadnje vrijeme se povećava potražnja za relativno jeftinim izvorima proteina koji se mogu ugraditi u prehrambene proizvode i povećati njenu prehrambenu i nutritivnu vrijednost. Širom svijeta velik dio istraživanja odnosi se na različite izvore biljnih proteina koji bi mogli povećati nutritivnu vrijednost prehrambenih proizvoda, a ujedno su jeftin izvor visoko kvalitetnih proteina. Do sada je, u tu svrhu, najviše istraživanja provedeno na proteinima uljarica, žitarica, mahunarki i biljnih listova (Haque i sur., 2016).

Proteini životinjskog podrijetla promoviraju se kao kvalitetniji od biljnih proteina, zbog svoje visoke probavljivosti, boljeg aminokiselinskog sastava i veće topljivosti u vodi. No, zbog velike konzumacije mesa i mesnih proizvoda i sve veće proizvodnje mesa sve je veći negativan utjecaj na okoliš pa se prehrambeni sustav okreće održivom razvoju. Rješenje problema održivosti proteina moglo bi biti prelazak na prehranu zasnovanu na biljnim proteinima. Probavljivost i manjak esencijalnih aminokiselina, što bi u principu trebali biti najveći nedostaci prilikom prelaska na biljne proteine, mogu se riješiti kombiniranjem proteina iz različitih biljnih izvora (Balandra'n-Quintana, 2019).

Rastuća potražnja za životinjskim proizvodima ima visoku cijenu za okoliš. Uzgojem stoke nastaje velika količina stakleničkih plinova, što pridonosi globalnom zagrijavanju (Balandra'n-Quintana, 2019). Najvažniji staklenički plinovi iz uzgoja životinja su metan i dušikov oksid. Metan, koji uglavnom nastaje fermentacijom unutar crijeva ili skladištenjem stajskog gnoja, plin je koji ima utjecaj na globalno zagrijavanje 28 puta veći od ugljikovog dioksida. Dušikov oksid, koji nastaje skladištenjem stajskog gnojiva i uporabom organskih/anorganskih gnojiva, molekula je koja ima potencijal globalnog zagrijavanja 265 puta veći od ugljikovog dioksida. Ekvivalent ugljikovog dioksida standardna je jedinica koja se koristi za obračun potencijala globalnog zagrijavanja. Slika 7 preuzeta je iz "Global Livestock Environmental Assessment Model (GLEAM)" kojeg je razvila Organizacije za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (eng. *The Food and Agriculture Organization*, FAO) i pokazuje u ekvivalentima ugljikovog dioksida udio stakleničkih plinova koji nastaju od glavnih stočarskih vrsta uzgajanih širom svijeta. Slika 7 prikazuje kako goveda najviše pridonose emisijama u sektoru s oko 5,0 gigatona CO<sub>2</sub>-eq (ekvivalenata CO<sub>2</sub>), što predstavlja oko 62% emisije od ukupne emisije uzrokovane uzgojem stoke. Svinja, perad, bivoli i mali preživači imaju znatno niže emisije, što predstavlja između 7 i 11% emisije uzrokovane uzgojem stoke.



**Slika 7.** Udio stakleničkih plinova izražen u ekvivalentima CO<sub>2</sub> nastao od glavnih stočarskih vrsta uzgajanih širom svijeta (FAO, 2021)

Još jedan od važnih razloga zašto bi bilo korisno životinjske proteine zamijeniti biljnim je to što alergija na protein kravljeg mlijeka pogađa 2% -7,5% djece mlađe od 3 godine. Općenito, ta su djeca najviše alergična na  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin i kazein, ali neka su alergična i na goveđi serumski albumin (*eng. bovine serum albumin*, BSA) (Deeth i Bansal, 2019). Osim alergija na mliječne proteine, mnogi su alergični i na šećer laktozu u mlijeku što je također jedan od razloga zašto je korisno napraviti biljne alternative mlijeka koje već danas možemo vidjeti na policama trgovina.

Za usporedbu, biljni se proteini mogu izravno koristiti za stvaranje alternativa sličnih mesu. Dakle, alternative, nadomjesci ili zamjene mesa na biljnoj bazi predstavljaju jedno novo područje interesa prehrambene industrije koje se brzo razvija. Ovi netradicionalni prehrambeni proizvodi za sobom nose značajna ulaganja, istraživačke studije, znatizeljnu potrošača i pažnju medija. Posvećenost svjetskih prehrambenih znanstvenika istraživanjima alternativa u posljednjih nekoliko godina dovela je do porasta broja istraživačkih publikacija o zamjenama mesu. Kao „zamjene“ za tradicionalne prehrambene proizvode životinjskog podrijetla, oni se često plasiraju kao „zdravija“ (od mesa) i održiva nova hrana (Godfray, 2019). S obzirom na brzi razvoj i velik broj provedenih istraživanja, proizvodi na bazi biljnih (*eng. plant-based*) proteina su već sada dobro pozicionirani na tržištu i ovo je područje spremno za daljnje širenje i inovacije. Kao primjer, u svibnju 2019. Impossible Foods su, u partnerstvu s Burger Kingom, lansirali plant-based Impossible Whoppers, a u siječnju 2020. godine, još dva "mesna" proizvoda na bazi proteina stavljena su na jelovnik restorana. U kolovozu 2019. KFC je počeo posluživati biljna "pileća krilca" i medaljone koje su razvili Beyond Meat i LightLife. Kroger,

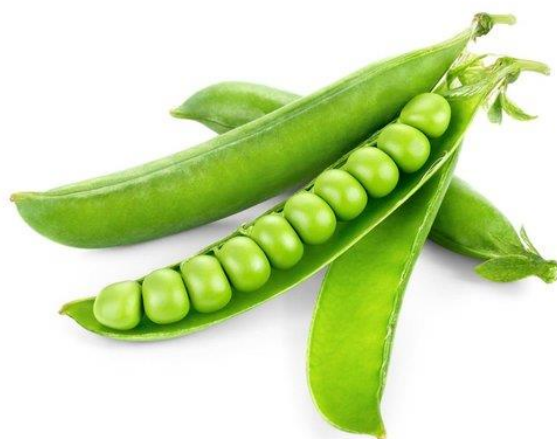
najveći lanac prehrambenih trgovina u SAD-u, također je predstavio "mljevenu govedinu" na bazi proteina graška, "burger pljeskavice" i druge proizvode na bazi biljnih proteina (Sha i Xiong, 2020).

## 2.8. BILJNI PROTEINI U KONTEKSTU ODRŽIVOSTI

Povećanje broja stanovništva i sposobnost proizvodnje hrane za sve veći broj ljudi jedno je od najvažnijih trenutnih pitanja u prehrambenoj industriji. Količina hrane sama po sebi nije najveći problem jer bi se, ako bi se rasporedila podjednako, mogla zadovoljiti prosječna globalna potražnja za hranjivim sastojcima. Ono što je zaista problem je održivost njihove proizvodnje. Iako je pojam održivosti hrane predmet mnogih tumačenja, definicija korištena u izjavi Svjetske komisije za okoliš i razvoj smatra se vrlo praktičnom. Izjavili su da se za prehranu cijele populacije moraju koristiti sredstva koja nemaju negativne posljedice na okoliš i koja ne ugrožavaju prirodne resurse budućih generacija. Trenutni sustav proizvodnje hrane ima snažan utjecaj na okoliš koji se mora ubrzo promijeniti kako bi se izbjegle posljedice većeg opsega. U kontekstu masovne proizvodnje hrane, proteini su u središtu pozornosti zbog bitnih bioloških funkcija koje obavljaju i jer se već dugo promovira kako su proteini životinjskog podrijetla kvalitetniji. Stoga, veća kupovna moć stanovništva potiče veću potrošnju proteina životinjskog podrijetla, što zauzvrat pokreće intenzivnu proizvodnju peradi, stoke i ribe. Rastuća potražnja za životinjskim proteinima ima visoku cijenu za okoliš. S jedne strane, stoka ima veliku emisiju stakleničkih plinova, što pridonosi globalnom zagrijavanju. S druge strane, zbog neučinkovite konverzije biljnih proteina u životinjske proteine i dalje se povećava uzgoj životinja što rezultira velikom potražnjom za stočnom hranom, zbog čega se na velikim površinama siju monokulture žitarica, a to uzrokuje neselektivno krčenje šuma i iscrpljivanje podzemnih voda. Na koncu, nekoliko tisuća hektara zemlje se pretvara u pustinjska područja, zbog čega dolazi do nestašice vode, smanjenja proizvodnje hrane te posljedično migracije ljudi u neke povoljnije krajeve. Ovaj je problem pobudio stvarni interes za smanjenje potrošnje životinjskih proteinima, na način da ih se postepeno zamijeni s biljnim proteinima (Balandra'n-Quintana i sur., 2019; Grossi i sur., 2019).

## 2.9. GRAŠAK

Grašak (*Pisum sativum* L.) (Slika 8) je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodica Lepirnjača (*Fabaceae* syn. *Legumiosae*). Jedna je od prvih uzgajanih kultura i trenutno se uzgaja u većini dijelova svijeta umjerenih klimatskih uvjeta te je gospodarski vrlo značajna kultura. Grašak pripada obitelji biljaka *Leguminosae*, trećoj obitelji biljaka cvjetnica s 800 rodova i više od 18 000 vrsta (Warkentin i sur., 2015). Grašak sadrži jako puno škroba, čak 44% do 50%, dok je sadržaj vlakana 4,5% do 10%. Šećera ima jako malo oko 6%. Bogat je i proteinima, naročito aminokiselinama poput lizina i triptofana i nešto manji udio metionina i cisteina. Dobar je izvor mangana, bakra, fosfora, molibdena, cinka, magnezija, željeza, kalija, zatim vitamina C i folata te vitamine B grupe kojima grašak obiluje. Sorte graška koje imaju obojeni cvijet u odnosu na sorte graška koje nemaju obojeni cvijet u svom sastavu imaju i do 100 puta više kondenziranih tanina (Kiš, 2016; Friganović i sur., 2019).



**Slika 8.** Mahuna i sjemenke graška (John Erwin)

U zadnjih nekoliko godina industrija hrane okrenula se istraživanju biljnih proteina i mogućnostima njihovog iskorištenja, pri čemu su mahunarke prepoznate kao koristan i jeftin izvor visoko kvalitetnih proteina u obliku proteinskog praha, koncentrata i izolata. Grašak se naročito istraživao i nastojao iskoristiti u Kanadi i Europskim zemljama, gdje se prepoznala njegova vrijednost i gdje nastoje dio tržišta proteina soje zamijeniti proteinima graška. Smatra se da bi proteini graška mogli konkurirati proteinima soje zbog svojih funkcionalnih i nutritivnih svojstava, koji mogu biti jednako dobri kao i sojini, osim toga, grašak ima manju koncentraciju nenutritivnih komponenti kao što su inhibitori proteinaze i fitinska kiselina i nisu tako čest alergen kod ljudi kao što je to soja (Barać i sur., 2015).

### 2.9.1. Proteini graška

Sadržaj proteina u grašku varira i veliki utjecaj na njega ima genetika i okolišni faktori. Prosječan sadržaj proteina suhog graška je 20 do 30%. Razni autori su rezultatima svojih analiza dokazali da sadržaj proteina u grašku može varirati u granicama od 14% do 39% te da može varirati čak i u svakom zrnu iste biljke i to od 22% do 32%. Koncentracija proteina može se povećati i povezana je s primjenom dušika, fosfora i S-triazina te smanjenjem kalija u tlu (Aluko i sur., 2009).

Proteini graška uglavnom su skladišni proteini koji se sastoje od albumina i dva globulina, legumina i vicilina koji se mogu relativno lako otopiti i izolirati. Uz to, ove proteine karakterizira visok sadržaj lizina, koji nedostaje mnogim drugim proteinima biljnog podrijetla, uključujući i žitarice (Tömösközi i sur., 2001). Oko 70-80% sirovih proteina zrna mahunarki su skladišni proteini koji se primarno koriste kao izvor aminokiselina i dušika pri razvoju klice, a grašak sadrži i 10-15% neproteinskog materijala koji sadrži dušik. Proteini koji nisu skladišni su uglavnom enzimi, enzimski inhibitori, hormoni te transportni, strukturni i proteini za prepoznavanje (Ge i sur., 2020).

Globulini čine 65-80% proteina prisutnih u grašku. Dva glavna predstavnika globulina su legumin i vicilin, treći predstavnik globulina je konvicilin je također prisutan u zrnu graška, ali u malim količinama. Ovi su proteini pronađeni u proteinskim tijelima odnosno organelima koje služe kao vakuole za pohranu proteina (Lu i sur., 2019). Legumin je veći od vicilina, ima kvartarnu strukturu i njegova je molekularna masa 320 do 380 kDa, dok je molekularna masa vicilina 150 do 170 kDa. Zbog svoje zbijene kvartarne strukture, legumin je stabilan na višim temperaturama, a do promjena na leguminu dolazi tek na temperaturama iznad 90°C. Vicilin je trimerni protein koji za razliku od legumina nema aminokiselinu cistein pa ne tvori disulfidne veze. U usporedbi s vicilinom, legumin je manje topiv u otopinama soli, sporije koagulira na temperaturi od 95°C i sadrži veće količine sumpora i dušika. Temperaturna denaturacija vicilina ovisi o ionskoj jakosti, pa tako u slučaju na niskoj ionskoj jakosti vicilin može denaturirati pri 71.7°C, dok na višim ionskim jakostima denaturira na 82.7°C. Legumin je otporan na temperaturu, ali je zato puno osjetljiviji na promijene pH vrijednosti i na koncentraciju soli. On održava prirodnu strukturu samo na pH vrijednostima od 7 do 9, a prirodna struktura mu se narušava na ekstremnim pH vrijednostima, a potpuno se razara na monomere na pH 2.4. Vicilin je topljiv na pH 4.8, a osim toga vicilin sadrži i značajne količine kovalentno vezanog šećera kojeg ne sadrže niti legumin niti konvicilin. Warkentin i sur. (2015) su naveli da je omjer vicilin:legumin u grašku 0,4:2,0. Sastav aminokiselina u visoko pročišćenim proteinima graška

pokazao je da legumin sadrži arginin te više aminokiselina koje sadrže sumpor te se smatra nutritivno vrjednijim, dok vicilin sadrži više isoleucina, leucina, fenilalanina i lizina. Konvicilin je treći predstavnik globulina, u proteinima graška nalazi se u malim koncentracijama i njegova molekulska masa iznosi 280 kDa uključujući N-terminalne produžetke (Rubio i sur., 2013; Barać i sur., 2015).

Albumini čine 20-35% ukupno ekstrahiranih proteina graška, a omjer albumin:globulin iznosi 1:3, odnosno varira između 1:2,2 i 1:3,8. Albumini su uglavnom enzimi i metabolički proteini. Schroeder je identificirao dva albumina molekulske mase 8,000 i 22,000 Da koji čine skupa 34% ukupnog udjela albumina. Aminokiselinski sastav albumina smatra se nutritivno bogatiji i prihvatljiviji od nutritivnog sastava globulina, posebno kada su u pitanju treonin i aminokiseline koje sadrže sumpor (Lu i sur., 2019).

U grašku je pronađeno i nekoliko proteina u malim koncentracijama koji su važni prilikom procesuiranja i/ili iskorištenja dijelova graška. Ti proteini su lipoksigenaze, tripsin inhibitori i lecitin. Lipoksigenaze doprinose kako pozitivnim tako i negativnim efektima u hrani. Na primjer, ukoliko je lipoksigenaza prisutna i brašnu soje u koncentraciji od 4,5% do 1,5% može poboljšati svojstva pečenih proizvoda, dok ukoliko je lipoksigenaza prisutna u mahunarkama povezuje se s razvojem lošeg mirisa/okusa (off-flavor) prilikom skladištenja. Veliki broj mahunarki sadrži proteine koji imaju sposobnost inhibiranja proteolitičke aktivnosti određenih probavnih enzima, pa tako i grašak sadrži inhibitor tripsina, od čega je 90% pronađeno u kotiledonu, a 10% u ljusci (Xu i sur., 2020).

#### 2.9.2. Funkcionalna svojstva proteina graška

Ge i sur. (2020) su u svom radu ispitivali sposobnost vezanja vode i ulja proteina graška te dokazali da je WHC proteina graška 2,7 g/g, a OHC 2,8. Slične vrijednosti dobili su Zhao i sur. (2020) te dokazali da su WHC i OHC graška niži u usporedbi s proteinima soje, a to su zaključili još ranije Tömösközi i sur. (2001). Sposobnost vezanja vode je bitna karakteristika proteina u proizvodnji hrane kao što su kobasice, tijesto, kreme i slični, gdje nema dovoljno vode da se proteini mogu otopiti, ali gdje hidratirani proteini daju strukturu (bubrenje, geliranje) i viskoznost hrani. Tömösközi i sur. (2001) su dokazali da je topivost izolata proteina graška slična proteinima ostalih mahunarki. Proteini graška dobro su topivi u alkalnim otopinama, slabije su topivi u kiselim otopinama, a najmanje u topivi u otopinama pH vrijednosti njihove izoelektrične točke. U usporedbi s prahom ostalih mahunarki neki su autori dokazali da proteinski prah graška ima lošija svojstva emulgiranja. No također je dokazano da se povećanjem koncentracije proteina povećava i kapacitet emulgiranja, pa je tako izolat proteina



graška pokazao slična emulgirajuća svojstva izolatu proteina soje, a osim toga bolja sposobnost emulgiranja proteina graška dokazala se kada je grašak klijaio prije obrade proteina. Sposobnost pjenjenja proteina graška smatra se da je u granicama od 43 do 430%. Neki radovi su dokazali da je sposobnost pjenjenja proteina graška puno lošija u usporedbi sa proteinima soje ili slanutka. Utvrđeno je da koncentrat proteina graška klasificiran zrakom ima dobru ekspanziju pjene, ali lošu stabilnost, a slični rezultati dobiveni su i za izolate proteina graška. Tijekom istraživanja literature, primijećeno je da rezultati variraju od autora do autora, a mogući razlozi razlikovanja rezultata su razlika u čistoći analiziranih proteina, razlika u metodi izolacije proteina, posebni uvjeti korišteni prilikom analize ili drugačiji uvjeti procesiranja (Barać i sur., 2015). Na koncu, može se reći da je zbog povoljnog aminokiselinskog sastava i prihvatljivih funkcionalnih svojstava izolat proteina graška potencijalni izvor proteina za obogaćivanje nekih prehrambenih proizvoda.

### 2.9.3. Iskorištenje proteina graška

Već su provedena istraživanja na temelju kojih se htjela dokazati mogućnost iskorištavanja proteina graška. Tako je na primjer dokazano da bi se proteini graška mogli koristiti kao dodatak brašnu prilikom proizvodnje pekarskih proizvoda, na način da se 20% brašna žitarica zamjeni proteinima graška koji bi poboljšali kvalitetu i nutritivna svojstva pekarskog proizvoda. Mana ovakvog iskorištavanja proteina graška je ta što bi se u toj situaciji morali koristiti dodatni aditivi kako bi tekstura proizvedenog pekarskog proizvoda bila što sličnija originalnom obliku proizvoda. Slično pekarskim proizvodima, tjestenina proizvedena samo od brašna žitarica nema dovoljno proteina, stoga su se proteini graška pokušala inkorporirati u tjesteninu. Dokazano je da se takva tjestenina skuha puno brže i ima veći izvor proteina. Mane bi mogle biti intenzivan okus i drugačija boja, no one bi se mogle nadvladati kuhanjem proteina graška prije suplementacije, a i boja tjestenine bi izbljedila tijekom kuhanja. Osim u pekarskim proizvodima i u proizvodnji tjestenine, proteini graška pokušali su se koristiti i u proizvodnji keksa te su također pokazali dobre rezultate. Tijesta koja su sadržavala proteine graška bila su manje ljepljiva od onih bez proteina graška i s njim se moglo lakše rukovati. Proteini graška su se pokušali koristiti i kako zamjena za mlijeko, odnosno za proizvodnju biljnog mlijeka s obzirom na dobra emulgirajuća svojstva proteina graška. Proteini graška su se koristili i za razne druge proizvode kao što su žele bomboni, tofu, juhe i snack proizvodi (Lu i sur., 2019).

## 2.10. BOB

Bob (*Vicia faba* L.) dobar je izvor održivih biljnih proteina i trenutno se ne iskorištava dovoljno. Širok uzgoj i ubrzano širenje boba u umjerenim i suptropskim predjelima svrstava bob na četvrto mjesto najvažnijih mahunarki u svijetu, odmah uz grah, grašak i slanutak. Zrna boba (Slika 9) su odličan izvor proteina, energije i vlakana, a biljka se uzgaja za hranu i hranu za životinje. Iako se u zapadnim zemljama manje konzumira kao ljudska hrana, bob se smatra jednim od glavnih izvora jeftinih proteina i energije u Africi, dijelovima Azije i Latinske Amerike, gdje većina ljudi ne može priuštiti mesne izvore proteina. Uz to što sadrži velike količine proteina, odličan je izvor minerala i mineralnih tvari. Mahunarke su bogat izvor mnogih mikroelemenata koji često nedostaju ljudskoj prehrani. Sjeme mahunarki uglavnom ima veće koncentracije minerala (npr. Fe, Zn, Ca i Mg) od žitarica (Khazaei i Vandenberg, 2020).



**Slika 9.** Mahuna i sjeme boba (Papanikou, 2020)

Bob se tradicionalno koristi kao pokrovna kultura za oporavak sadržaja dušika u tlu i sprečavanje erozije tla, a cijenjen je i zbog svojih dobrih agronomskih karakteristika (Vioque i sur., 2012). Nutritivno je bogat s obzirom na omjer proteina i ugljikohidrata u usporedbi s drugim mahunarkama, a isto tako i s obzirom na sastav esencijalnih aminokiselina (Sharan i sur., 2020).

### 2.10.1. Proteini boba

Sadržaj bjelančevina u zrnu boba kreće se od 24% do 35% suhe tvari sjemena, u prosjeku 29%. Ima velike količine lizina, koji je ujedno i esencijalna aminokiselina u ljudskoj prehrani. Većinu ovih proteina čine globulini (79%), albumini (7%) i glutelini (6%). Sjeme mahunarki sadržava

i nekoliko manjih bjelančevina kao što su inhibitori tripsina, lecitin, lipoksigenaza i ureaza, koji utječu na nutritivnu kvalitetu mahunarke (Khazaei i Vandenberg, 2020). Ono što je također vidljivo na SDS-PAGE su vrpce na ~68, ~59 i ~51 kDa koje vjerojatno odgovaraju podjedinicama globulina konvicilin, legumin i vicilin (Vogelsang-O'Dwyer i sur., 2020). Otprilike 80% masenog udjela ukupnih proteina sjemena čine enzimski neaktivni proteini za skladištenje, prisutni u kotiledonima sjemenki koji opskrbljuju sjeme hranjivim tvarima kako bi sjeme prokljalo u sadnicu. Proteini za pohranu postoje kao proteinska tijela koja okružuju veće granule škroba unutar pojedinih stanica unutar mikrostrukture kotiledona (Sharan i sur., 2020).

Analiza aminokiselina otkrila je da je aminokiselinski sastav proteina u sjemenkama boba sličan sastavu ostalih mahunarki i karakterizira ga dobra prehrambena kvaliteta, osim što mu nedostaje sumpornih aminokiselina i triptofana prema preporukama FAO (Vioque i sur., 2012). Esencijalne aminokiseline u proteinima boba imaju manje metionina i cisteina, a više lizina u usporedbi sa sojom. Također u bobu su analizirane visoke koncentracije arginina., te visoke koncentracije glutaminske i asparaginske kiseline. Sve mahunarke imaju uglavnom niske koncentracije metionina i cisteina, no taj se nedostatak može nadoknaditi konzumiranjem npr. proteina žitarica koji imaju visoke koncentracije aminokiselina sa sumporom (Mortuza i sur., 2009).

#### 2.10.2. Funkcionalna svojstva proteina boba

Keivanianahr i suradnici su u svom radu 2021. godine dokazali da većina proteina mahunarki pa tako i proteini boba imaju nisku topljivost u usporedbi s proteinima sirutke koji su gotovo potpuno topljivi. Zbog svoje niske topljivosti, ti proteini neće biti visoko učinkoviti u procesima otapanja, emulgiranja ili stvaranja pjene. Također, smatraju da proteini vjerojatno imaju više hidrofobnih dijelova na površini molekule stoga neće davati dobru disperziju u vodenoj otopini. Sposobnost emulgiranja povećava se koncentracijom proteina, a zagrijavanje emulzije na 80°C tijekom 30 minuta nema utjecaja na njezinu stabilnost, pa se stabilnost emulzije pokazala dosta visokom. Ovim su podacima dokazali da proteini boba imaju visoki hidrofobni karakter u skladu s činjenicom da se stabilnost emulzije povećava s hidrofobnim karakterom proteina. Higroskopnost u slučaju dvaju različitih uzoraka pokazala se većom kod uzorka veće koncentracije. U istraživanju Mortuze i sur. iz 2009. godine dokazao je da je sposobnost vezanja vode proteina boba usporediva s većinom mahunarki te da se proteini boba mogu koristiti u formulacijama raznih prehrambenih proizvoda, a također je dokazano da se vrijednost sposobnosti vezanja ulja proteina boba može usporediti s vrijednošću većine mahunarki.

Kapacitet pjenjenja i stabilnost pjenjenja važna su svojstva prehrambenih proizvoda kao što su kruh, kolači, krekeri, sladoledi i nekoliko drugih pekarskih proizvoda kako bi zadržali teksturu i strukturu tijekom ili nakon obrade. Mortuza i sur. (2009) u svom radu tvrde da su sposobnost pjenjenja i stabilnost pjenjenja proteina boba viši u usporedbi s ostalim mahunarkama.

### 2.10.3. Iskorištavanje proteina boba

Jedan od razloga zašto je bob preferiran u usporedbi s ostalim mahunarkama je njegov visok sadržaj proteina, što proizvođačima omogućava korištenje bobovog brašna ili proteinskog praha u proizvodnji prehrambenih proizvoda obogaćenih proteinima. U proizvodnji kruha, peciva, tjestenine, brašno boba pokazalo se odlično u svrhu povećanja koncentracije proteina u proizvodu. Zamjenom pšeničnog brašna s 30% brašna boba, koncentracija proteina poveća se za čak 11,6 do 16,5%. Ista je situacija u proizvodnji tjestenine, brašno za proizvodnju tjestenine se može zamijeniti s 30% brašna boba što poveća koncentraciju proteina, ali isto tako poveća i udio vlakana u tjestenini što doprinosi senzorskim i fizikalno-kemijskim svojstvima. Proteini boba preporučuju se također u proizvodnji smoothieja i shakeova. Osim što se proteini boba mogu iskoristiti u proizvodnji prehrambenih proizvoda i škrob iz boba se može iskoristiti na primjer u proizvodnji kolača i keksa bez glutena te rezanaca za juhe i umake. Proteini boba su testirani i u proizvodnji ekstrudiranih proizvoda te je dokazano da se mogu iskoristiti u proizvodnji žitarica za doručak, čipsa ili ekstrudiranih snack proizvoda jer imaju odlična svojstva ekspanzije. Prednost boba je što ima prirodno neutralan okus i boju što će pozitivno utjecati na proizvodnju jer neće utjecati na okus, a omogućuje korištenje raznih bojila i okusa kako bi se ugodile preferencije potrošača (Chiremba i sur., 2018).

### 2.11. RIŽA

Riža (*Oryza sativa* L.) (Slika 10) predstavlja jednu od vodećih prehrambenih kultura na svijetu, s globalnom godišnjom proizvodnjom koja se procjenjuje na oko 480 milijuna tona (osnova mljevene riže), a danas se uzgaja u više od 100 zemlje, na svim kontinentima, osim na Antarktiku. Jestivi dio biljke riže je njezina jezgra koja je obavijena s ljuskom koja nije jestiva. Uklanjanjem nejestive ljuske dobiva se smeđa riža s nekoliko slojeva "mekinja" (Amagliani i sur., 2017).



**Slika 10.** Riža i sjeme riže (Anonymus 1)

Riža je kasnila s pripitomljavanjem u usporedbi s ječmom i pšenicom, no otkako je uzgojena konstantno se selektirala u svrhu dobivanja što kvalitetnijih osobina, a s vremenom je postala i jedna od gospodarski najjačih žitarica. Osnovna je hrana za više od polovice svjetske populacije, uglavnom u azijskim zemljama, gdje milijunima ljudi osigurava znatan udio proteina. Niz studija naglasio je prehrambene i zdravstvene prednosti povezane s konzumacijom proteina riže. Prosječna dnevna konzumacija riže po stanovniku na svjetskoj razini 2011 godine iznosila je 60 kg/godišnje, dok je samo u azijskim državama iznosila 100 kg/godišnje. Riža osigurava gotovo 20% unosa kalorija u svijetu, što je čini najvažnijom kulturom u svjetskoj prehrani ljudi. Riža se danas konzumira u obliku cjelovitog ili mljevenog zrna, a osim toga raste proizvodnja rižinih proizvoda kao što su rižini rezanci, rižini krekeri, rižine pahuljice i grickalice. Rižini proizvodi pružaju mogućnosti razvoja bezglutenskih proizvoda i stoga su dostupni u širokom rasponu bezglutenskih prehrambenih proizvoda. (Amagliani i sur., 2017; Hoogenkamp i sur., 2017).

#### 2.11.1. Proteini riže

Proteini riže kategorizirani su u četiri glavne frakcije proteina na temelju topljivosti: albumin (topiv u vodi), globulin (topiv u soli), glutelin (topljiv u lužinama/kiselinama) i prolamin (topljiv u alkoholu). Frakcije nastale mljevenjem rižinog zrna razlikuju se po sastavu proteina, a sukladno tome razlikuju se i po nutritivnoj vrijednosti. Podaci navedeni u literaturi o svojstvima rižinih proteina uvelike se razlikuju, ovisno o sorti riže i postupcima ekstrakcije. Glutelin je glavna frakcija proteina u smeđoj i mljevenoj riži (60-80% ukupnih proteina), dok prolamina, koji predstavlja glavni protein za pohranu u svim ostalim žitaricama, ima u najmanjoj količini (1-5%) u svim frakcijama mljevenog zrna riže (Amagliani i sur., 2017). Albumina u riži ima 4-22%, dok globulina ima 5-13% i ova dva proteina se u smeđoj riži nalaze u većoj koncentraciji nego u bijeloj riži. Budući da se mljevenje vrši do različitih stupnjeva

mljevenja, znanstvenici tvrde da se dužim lijevanjem uklanja više slojeva ljuske riže koja sadrži veliku količinu proteina što u konačnici rezultira smanjenom količinom proteina u mljevenoj riži. Riža sadrži skladišne proteine, ali i biološki aktivne kao što su enzimi, neke lipaze, amilaze, katalaze, oksidazu askorbinske kiseline, citokrom oksidaze, polifenol oksidaze, dihidrogenaze i esteraze (Hoogenkamp i sur., 2017).

Albumin je protein koji je topljiv u vodi i koagulira s povećanjem temperature, sadrži male količine disulfidnih veza i najzastupljeniji je u ljusci (mekinjama) riže. Rižin albumin je lako probavljiv protein koji se lako apsorbira. Frakcije albumina sadrže proteine molekularne mase u granicama od 10-200 kDa. pI albumina je 4.1 i 6.4. Globulini su proteini topivi u soli, bogati cisteinom i metioninom, ali siromašni lizinom. Oni čine 15-36% mekinja riže. Globulini mljevene riže imaju molekularne mase u rasponu od 16 do 25 kDa. Prolamini su proteini topivi u alkoholu i čine oko 4% ljuske riže. Prolamini su bogati glutaminom, alaninom, glicinom i argininom, ali siromašni lizinom. Prolamin sadrži frakcije proteina molekularne mase u granicama od 10-17 kDa. Njegova pI je pH 6.0-6.5. Glutelini su proteini koji čine najveći udio proteina u rižinoj ljusci, izrazito su agregirani, glikozilirani i vezani disulfidnim vezama te stoga teško topivi u vodi, ali izrazito topivi u jako bazičnim i kiselim otopinama. Rižini glutelini su heterogeni i sastavljeni su od dvije glavne polipeptidne podjedinice, prva kisela ili alfa podjedinica od 30-40 kDa i druga bazična tj. beta podjedinica molekularne mase od 19-23 kDa. Rižini glutelini dijele se u grupe A i B, a tip B je bogat lizinom. Temperature denaturacije rižinog albumina, globulina i glutelina iznose 73,3°C, 78,9°C i 82,2°C (Hoogenkamp i sur., 2017; Amagliani i sur., 2017).

Pojedinačna analiza rižinih proteina pokazala je da prolamin ima najmanju količinu lizina, dok najveću koncentraciju lizina ima albumin, a zatim glutelin i globulin, a s obzirom na velike količine albumina riža je žitarica koja sadrži najveće količine lizina u usporedbi s ostalim žitaricama. Što se tiče ostalih esencijalnih aminokiselina, albumin ima visoke koncentracije histidina i treonina, dok prolamin ima visoke koncentracije izoleucina, leucina i fenilalanina. Nadalje, globulin ima visoke koncentracije aminokiselina koje sadrže sumpor, cisten i metionin, dok prolamin ima najmanje takvih aminokiselina (Amagliani i sur., 2017).

#### 2.11.2. Funkcionalna svojstva proteina riže

Topljivost proteina izravno je povezana s fizikalno-kemijskim karakteristikama površine proteina. Rižini proteini pokazuju minimalnu topljivost pri pH vrijednosti 4-5, dok se topljivost povećava povećanjem bazičnosti, odnosno kiselosti. Topljivost rižinih proteina ovisna je o pH vrijednostima najviše zbog svojstava glutelina, s obzirom da glutelin čini većinu rižinih

proteina. Visoka netopljivost rižinog glutelina u vodi uglavnom je posljedica njegove izrazite agregacije i umrežavanja disulfidnim vezama, a ekstremne pH vrijednosti dovode do razaranja agregata zbog čega se povećava topljivost. Što se tiče emulgirajućih svojstava, emulzijska aktivnost pokazala se dosta niska, naročito na pH vrijednostima manjim od 6, ali se ista može popraviti dodatkom ksantan gume, zbog povećanja viskoznosti. Emulzijski kapacitet proteina bijele riže, smeđe riže i rižinih mekinja je minimalan pri pH 5, a značajno poraste kod nižih i kod viših pH vrijednosti. Proteini smeđe riže, bijele riže i rižinih mekinja pokazali su maksimalne volumene emulgiranja od 44, 47, odnosno 43% pri pH 11. Emulzijska stabilnost je imala jednak trend kao emulzijski kapacitet, ali je bila maksimalna na pH 3. Ovaj rezultat pripisan je niskoj površinskoj hidrofobnosti izolata proteina rižinih mekinja, što je dovelo do slabije interakcije između proteina i ulja (Zhao i sur., 2020). Kad je u pitanju vezanje vode, izolati proteina iz rižinog endosperma i rižinih ostataka pokazali su kapacitet vezanja vode od 2.81 odnosno 3.02 g/g, a neki znanstvenici su utvrdili da je kapacitet vezanja vode veći kod proteina iz ljuske riže već kod proteina u samoj bijeloj ili smeđoj riži. Prema literaturi, sposobnost vezanja ulja proteinskih izolata iz rižinog endosperma i rižinog otpada iznosi 2.12 i 2.38 g/g, a neki autori tvrde da proteini riže imaju veću sposobnost vezanja ulja od kazeina. Proteini s visokim kapacitetom vezanja ulja mogu se koristiti u formulacijama hrane kao što su majoneza, dressing za salatu, kobasice i tijesta za kolače (Amagliani i sur., 2017). Prema podacima iz literature o funkcionalnim svojstvima, rižini proteini mogli bi predstavljati važne sastojke s dodanom vrijednošću prilikom upotrebe u proizvodnji novih prehrambenih proizvoda.

### 2.11.3. Iskorištenje proteina riže

Riža je općenito prepoznata kao hipoalergena hrana te je među prvima kao čvrsta hrana uvedena u prehranu djece, a osim toga često se koristi u eliminacijskim dijetama za dijagnosticiranje alergija na hranu kod djece i odraslih. Stoga, formulacije bazirane na rižinim proteinima predstavljaju dobru alternativu za djecu alergičnu na kravlje mlijeko. Rižini proteini se danas često nalaze na policama s prehranom za sportaše, gdje služe kao zamjena često korištenom kazeinu, sirutki i sojinim proteinima. Neke studije su pokazale kako se rižini proteini mogu koristiti kao sastojci s dodatnom vrijednošću u proizvodnji kruha, keksa i jestivih filmova s poboljšanim hranjivim i funkcionalnim svojstvima. Općenito niska topljivost proteina riže u vodi ograničava njihovu potencijalnu primjenu na proizvode koji ne zahtijevaju visoku topljivost proteinskih sastojaka, npr. pekarski proizvodi, žitarice za doručak, proteinske pločice ili hrana za kućne ljubimce. Međutim, funkcionalnost proteina riže može se poboljšati

enzimskom hidrolizom, omogućavajući upotrebu ovih proteinskih sastojaka u širem rasponu prehrambenih proizvoda, uključujući juhe, umake, preljeve za salate, kreme za kavu, pića, proizvode u kliničkoj prehrani ili farmaceutske proizvode. Važno je naglasiti da je rižino brašno danas jedno od najčešće korištenih sastojaka u proizvodnji hrane bez glutena, kao što su kruh i tjestenina, a rižini proteini značajno doprinose kvaliteti i tehnološkoj funkcionalnosti ovih proizvoda (Amagliani i sur., 2016; Amagliani i sur., 2017).

## 2.12. KONOPLJA

Konoplja (*Cannabis sativa* L.) jednogodišnja je zeljasta biljka koja pripada obitelji Cannabaceae i koja se tradicionalno uzgaja zbog vlakana (nazvanih i floemska vlakna) u svojoj stabljici. Vlakna konoplje vrlo su vrijedna sirovina za proizvodnju trajnih tkanina i specijalnih papira. Međutim, visoka razina tetrahidrokanabinola (THC) već dugo ometa široku upotrebu sjemena konoplje kao hrane u drugim dijelovima svijeta. Prije otprilike dva desetljeća industrijska konoplja s niskom razinom THC-a (<0,3%) postala je dostupna u nekoliko zemalja, posebno u Kini i Kanadi, što je dovelo do povećane komercijalizacije hrane formulirane sa sjemenkama konoplje. Prerada sjemena konoplje nakon berbe uključuje sušenje radi smanjenja sadržaja vlage na  $\leq 10\%$ , što pomaže u sprečavanju rasta klica tijekom skladištenja. Sjeme (Slika 11) se zatim uglavnom preša s ciljem proizvodnje ulja, a zdrobljeni ostatak sadrži vrijedne bjelančevine, stoga se on melje, sije i prodaje za prehranu ljudi i životinja (Aluko, 2017).



**Slika 11.** Sjeme konoplje (Anonymus 2)

Uz značajne količine dijetalnih vlakana, sjeme obično sadrži preko 30% ulja i oko 25% proteina. Ulje konoplje sadrži preko 80% polinezasićenih masnih kiselina, stoga je iznimno



vrijedno za prehranu ljudi. Proteini (uglavnom edestin i albumin) u sjemenkama konoplje također su vrlo hranjivi i bogati esencijalnim aminokiselinama te se lako probavljaju. Iz sjemena konoplje izolirani su i metionin i cistein, pa proteini iz konopljinog sjemena imaju dobar potencijal za primjenu u prehrani i predstavljaju vrijedan izvor proteinske prehrane (Żuk-Gołaszewska i Gołaszewski, 2020).

Biljka konoplje apsorbira ugljični dioksid do pet puta učinkovitije (smanjuje globalno zagrijavanje) od iste površine šumskog drveća i ima vrlo kratko razdoblje zrenja od 3 do 4 mjeseca. Prerada konopljinih vlakana također smanjuje opterećenje toksinima iz okoliša jer biljka ima nizak udio lignina koji se može pretvoriti u kašu koristeći manje kemikalija od običnog drva. Vlakna konoplje također su prirodno svjetlija od običnog drveta i mogu se izbjeljivati vodikovim peroksidom umjesto klorovim dioksidom, što smanjuje količinu izuzetno otrovnog dioksina koji završava u potocima. Konoplja je prirodno otporna na štetočine i zahtijeva malo ili nimalo pesticida, što konoplju čini izuzetno ekološki prihvatljivom kulturom. Njegov duboki korijenski sustav također je vrlo koristan jer je učinkovit u sprječavanju erozije, čišćenju tla i prozračivanju tla za buduće usjeve, kada se uzgaja u rotaciji s drugim usjevima (Aluko, 2017).

#### 2.12.1. Proteini konoplje

Sjeme konoplje sadrži oko 30% ulja i oko 25% proteina, oba sastojka visoke nutritivne vrijednosti, a uz to sadrže i 10 do 15% netopivih vlakana. Ulje je posebno bogato polinezasićenim masnim kiselinama, naročito vrstama omega-3 i omega-6 koji čine 80% masnih kiselina, dok su proteini bogati esencijalnim aminokiselinama i argininom. Sjeme konoplje sadrži uglavnom skladišne proteine (proteine za pohranu), koje čine albumin (25-37%) i legumin poznat kao edestin (67-75%). Ne sadrži inhibitore proteaze zbog čega doprinosi boljoj probavljivosti proteina. Sastav esencijalnih aminokiselina u sjemenu konoplje je bolji nego u sjemenu soje. Visok sadržaj arginina čini protein konoplje posebno vrijednim kao nutritivni sastojak za formuliranje hrane koja poboljšava zdravlje kardiovaskularnog sustava. Razlog tome je što je arginin preteča dušikovog oksida, vazodilacijskog sredstva koje pojačava protok krvi i doprinosi održavanju normalnog krvnog tlaka (Aluko, 2017).

Legumin (globulin), također nazvan edestin, glavna je frakcija proteina (~75%) u sjemenu konoplje, a sastoji se uglavnom od 11S i 7S tipa proteina. Gel elektroforezom određena je molekulska masa globulina od 300 kDa. Literatura ukazuje na to da 7S tip proteina nema termičkih promjena, dok je 11S imao temperaturu denaturacije od 91,9°C što je slično temperaturi 92,0°C koja je potvrđena kao točka denaturacije izolata proteina sjemena konoplja.

Albumin čini ~25% proteina za skladištenje sjemena konoplje. Albumin ima veću fleksibilnost i manje kompaktnu strukturu od globulina. Međutim, sekundarna struktura albumina pokazala je uređeniji raspored polipeptida od globulina. Korištenjem nekoliko protokola pročišćavanja, iz sjemenki konoplje izoliran je protein od 10 kDa (2S albumin) i pokazalo se da se sastoji od dva polipeptidna lanca (mali i veliki) s 27, odnosno 61 aminokiselinskim ostatkom i taj protein je izuzetno bogat aminokiselinama koje sadrže sumpor (cistein i metionin) (Aluko, 2017).

#### 2.12.2. Funkcionalna svojstva proteina konoplje

Kapacitet pjenjenja globulina vrlo je loš u odnosu na albumin; međutim, sposobnost stvaranja emulzije slična je emulzijama mlijeka. Snažna sposobnost emulgiranja sugerira hidrofobni karakter zbog kojeg globulin dobro komunicira s uljnom fazom i ukazuje na potencijalni sastojak za formuliranje raznih visokokvalitetnih emulzija hrane u vodi. Visok stupanj fleksibilnosti i uređena sekundarna struktura vjerojatno su strukturni čimbenici koji pridonose visokoj topljivosti i kapacitetu pjenjenja albumina u usporedbi s kompaktnijim ili agregiranim globulinom. Albumin također stvara visoko kvalitetne emulzije kao i globulin (Aluko, 2017). Malomo i Aluko su 2014. u znanstvenom radu ispitivali i uspoređivali funkcionalna svojstva proteinskog izolata sjemena konoplje te svojstva proteina u nusproizvodu konoplje koji zaostaju nakon proizvodnje ulja. Sposobnost vezanja vode i sposobnost geliranja su kod nusproizvoda bile veće nego kod izolata, ali je sposobnost vezanja ulja kod izolata bila veća nego kod nusproizvoda. Sposobnost pjenjenja oba uzorka je bila dosta slična na svim ispitanim pH vrijednostima. Proteini nusproizvoda konoplje dali su bolje rezultate emulgiranja, iako su oba imali visoku sposobnost održavanja stabilnosti emulzije što im daje mogućnost korištenja u novim prehrambenim proizvodima.

#### 2.12.3. Iskorištenje proteina konoplje

Konoplja i njeno iskorištavanje u prehrambenoj industriji, ali i u mnogim drugim industrijama postala je jedna od aktualnih tema zadnjih nekoliko godina. Dijelovi biljke konoplje kao što su sjemenke, oljušteno sjeme i ulje se danas već nalaze na policama trgovina u Europi i Sjevernoj Americi. Četvrti sastojak proizveden iz konoplje je kanabidiol (CBD) koji je stekao popularnost u wellness proizvodima i kao sastojak hrane. Konopljini proteini su antialergijski proteini na biljnoj bazi i potencijalno bi se mogli miješati s drugim antialergijskim biljnim proteinima. Zbog relativno visokog sadržaja proteina u konoplji (25%), ona je održiva alternativa drugim biljnim izvorima s visokim udjelom proteina. Konopljini proteinski koncentraci i izolati mogu se koristiti kako bi obogatili proizvode kao što su proteinske pločice ili žitarice, iako ih danas na policama možemo pronaći i obliku proteinskih prahova koji su namijenjeni sportašima. Osim

toga, mogu se koristiti i kao proteinski napitci na bazi konoplje, iako topljivost proteina može ograničiti količinu koja se ugrađuje u napitak. U posljednje vrijeme provode se i istraživanja o obogaćivanju brašna konopljinim proteinima kako bi se dobili proteinima obogaćeni pekarski proizvodi. Konoplja je, osim proteinima, bogata i vlaknima pa može služiti i kako bi vlaknima obogatila snack proizvode, a konopljino ulje čini odličan prehrambeni proizvod jer sadrži oko 80% višestruko nezasićenih masnih kiselina, uključujući i esencijalne omega-3 i omega-6 masne kiseline (Auri, 2019).

### 2.13. SREBRNA POKOŽICA KAVE

Srebrna pokožica kave tanak je sloj koji izravno pokriva sjeme kave (Slika 12). Ona predstavlja oko 4,2% zrna kave (Iriundo-DeHond i sur., 2018). Tijekom postupka prženja zrno kave se širi i taj tanki sloj se odvaja te postaje jedan od glavnih nusproizvoda prženja kave. Srebrna pokožica 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 (Bessada i sur., 2018). U literaturi se naglašava bogatstvo srebrne pokožice kave u prehrambenim vlaknima (oko 60%, uglavnom netopivih prehrambenih vlakana), proteinima (oko 20%) te antioksidansima. Udio masnoće je nizak, uglavnom ispod 3%, a udio kofeina nalazi se u granicama oko 0,8 i 1,4% ovisno o geografskom porijeklu. Srebrna pokožica kave dobar je izvor mineralnih tvari (8%), kao što su uglavnom kalij, magnezij i kalcij (Machado i sur., 2020).



**Slika 12.** Srebrna pokožica kave (Jethwa i sur., 2018)

### 2.13.1. Proteini srebrne pokožice kave

Proteini srebrne pokožice kave nisu toliko istraženi te ih je potrebno dodatno istražiti kako bi se mogli donijeti konkretni zaključci vezani za mogućnost njihovog iskorištenja u prehrambenoj industriji. Ono što je danas poznato jest da je sadržaj proteina u srebrnoj pokožici kave zabilježen u značajnijim koncentracijama, oko 12 do 20%. Wen i sur. (2020) u svom radu tvrde da je prosječna molekulska masa proteina pokožice kave u rasponu od 4,99 do 6,89 kDa. Hranjiva svojstva proteina iz nusproizvoda kave mogla bi biti jednako vrijedna kao i drugi izvori proteina i mogla bi se primijeniti u mnoge svrhe, poput funkcionalnih sastojaka i pojačivača hrane/okusa.

### 2.13.2. Funkcionalna svojstva pokožice kave

Jethwa i suradnici (2018) su u svom znanstvenom radu određivali funkcionalna svojstva proteina srebrne pokožice kave. Dokazali su da je sposobnost vezanja ulja ovih proteina veća od sposobnosti vezanja vode. Također je utvrđeno da pokožica kave ima dobru sposobnost vezanja vode i ulja u usporedbi sa sojinim lecitinom, što ukazuje na njenu primjenu u stabilizaciji proizvoda s visokim udjelom masti i emulzija. Dokazali su da prisutnost proteina u srebrnoj pokožici kave pomaže vezanju vlakana s uljem i vodom što je bi značilo da se ti proteini mogu koristiti u proizvodnji hrane koja zahtjeva dugotrajnu stabilnost emulzije. Isto tako, srebrna pokožica kave sadrži proteine koji imaju veliku mogućnost pjenjenja i mogućnost održavanja dugotrajne stabilnosti pjene.

### 2.13.3. Iskorištenje srebrne pokožice kave

Ovaj nusproizvod bi se zbog svog sastava, primarno, mogao koristiti kao izvor antioksidativnih prehrambenih vlakana u hrani. Osim toga, ekstrakti pokožice mogli bi se koristiti kao prirodne boje i kao izvor prehrambenih vlakana u keksima. Moguća je i implementacija srebrne pokožice u antioksidativne napitke kojeg su Martinez-Saez i sur. (2014) pripremali sa svrhom kontrole tjelesne težine. Zbog arome koju je pokožica razvila prženjem, može se koristiti kao aroma dima u proizvodnji drugih prehrambenih proizvoda (Klingel i sur., 2020). Pokožica kave potencijalni je kandidat za zamjenu sintetičkih kemikalija kao aktivnih sastojaka u kozmetičkim formulacijama, zbog svog visokog antioksidativnog potencijala, fenolnih spojeva, melanoidina i kofeina (Bessada i sur., 2018). Srebrna pokožica može se koristiti kao izvor prehrambenih vlakana, u pekarskim proizvodima, u proizvodnji napitaka (čaj) ili kao aditiv za aromu dima (Klingel i sur., 2020).

## 2.14. SIRUTKA

Sirutka je nusprodukt proizvodnje sira (96%) i kazeina (4%) i sadrži približno 20% izvornih mliječnih bjelančevina. To je žuto-zelenkasta tekućina (Slika 13) koja se izdvaja iz gruša nakon koagulacije kazeina iz mlijeka djelovanjem kiseline (kisela sirutka) ili djelovanjem enzima (slatka sirutka) (Peters, 2016).



**Slika 13.** Sirutka (Anonymus 3)

Prema prosječnom kemijskom sastavu sirutka sadrži oko 93% vode, a u nju prelazi oko 50% suhe tvari mlijeka. Količina ove mliječnog nusproizvoda raste u cijelom svijetu, istodobno s globalnim porastom proizvodnje sira i, u manjoj mjeri, kazeina. Sirutka predstavlja bogatu i raznovrsnu mješavinu bjelančevina raznolikih kemijskih, fizikalnih i funkcionalnih svojstava. Ti proteini igraju važnu ulogu u prehrani kao izuzetno bogat i uravnotežen izvor aminokiselina. Bez obzira na veliki potencijal, od ukupne količine proizvedene sirutke 70% se prerađuje u različite prehrambene proizvode ili koristi u fermentativnoj industriji, dok se ostalih 30% koristi kao hrana za svinje, rasprostranjuje kao gnojivo na poljoprivredno zemljište ili ispušta u vodene tokove bez prethodne obrade. Nesavjesno zbrinjavanje sirutke predstavlja ozbiljan gubitak sirovine i uzrokuje znatne ekološke probleme (Matijević, 2018).

### 2.14.1. Proteini sirutke

Većina mlijeka sisavaca sadrži  $\beta$ -laktoglobulin koji čini oko 50% i je glavni predstavnik proteina sirutke, a čini čak 10-12% ukupnih proteina mlijeka. On je najzastupljeniji protein sirutke u mlijeku preživača kao što su krave, koze, ovce i bivoli, a nema ga u mlijeku pojedinih vrsta kao što su neki glodavci (miševi, štakori i zamorci), zečevi, čimpanze pa i ljudi. Koncentracija  $\beta$ -laktoglobulina u mlijeku može varirati ovisno o pasmini životinje, stupnju laktacije i čimbenicima okoliša poput sezone i prehrane.  $\beta$ -laktoglobulin sadrži 162 aminokiselinska ostatka i ima molekulsku masu od oko 18,3 kDa. Sadrži relativno veliku

količinu razgranatih lanaca aminokiselina i sumpornih aminokiselina. Visok sadržaj sumpornih aminokiselina može dovesti do njegovog sudjelovanja u aktivnom imunološkom sustavu  $\beta$ -laktoglobulin stabilan je na pH vrijednosti između 2,5 do 7,5. Reverzibilne promjene konformacije primjećuju se na temperaturi od 60°C, dok se ireverzibilne promjene dešavaju između 60°C i 70°C. Na temperaturama višim od 70°C nerazmotani monomeri se agregiraju i stvaraju  $\beta$ -laktoglobulin oligomere (Deeth i Bansal, 2019; Nastaj i Sołowiej, 2020).

$\alpha$ -laktalbumin je drugi najzastupljeniji protein sirutke u goveđem mlijeku, a predstavlja 20% ukupnih proteina sirutke i 3,5% ukupnih proteina u mlijeku. Koncentracija  $\alpha$ -laktalbumina u majčinom mlijeku varira zbog nekoliko čimbenika, uključujući genetske, okolišne i prehrambene čimbenike. Za razliku od  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin je prisutan u gotovo svim vrstama sisavaca. To je mali kompaktni protein koji je klasificiran kao metaloprotein kalcija, a vezanje kalcija je neophodno za pravilno presavijanje i stvaranje disulfidnih veza nativnog  $\alpha$ -laktalbumina. Molekulska masa  $\alpha$ -laktalbumina je 14,178 kDa.  $\alpha$ -laktalbumin ima vrlo visok sadržaj esencijalnih aminokiselina, čak 63,2% ukupnog sadržaja aminokiselina. Ključna biološka funkcija  $\alpha$ -laktalbumina je regulacija sinteze laktoze i stvaranje vodene faze mlijeka. Koncentracija laktoze u mlijeku proporcionalna je sadržaju  $\alpha$ -laktalbumina (Deeth i Bansal, 2019).

Serumski albumin u mlijeku gotovo svih vrsta prisutan je u znatno nižim koncentracijama u odnosu na  $\beta$ -laktoglobulin i  $\alpha$ -laktalbumin. Njegove koncentracija iznosi 8% proteina sirutke i 1,5% ukupnih proteina u mlijeku. Serumski albumin u mlijeku fizički je i imunološki identičan krvnom albuminu koji je glavni protein u krvi. Ne sintetizira se u mliječnoj žlijezdi već se transportira u mlijeko pasivnim istjecanjem iz krvotoka. Od proteina o kojima se govori u ovom poglavlju, serumski albumin, ili točnije BSA, ima ograničen potencijal kao industrijski proizvod. BSA se intenzivno koristi u biokemijskim i biomedicinskim istraživanjima kao model serumskog albumina, ali u tu svrhu koriste se samo relativno male količine (Deeth i Bansal, 2019).

Imunoglobulini (Ig) su u mlijeku prisutni u raznim oblicima. Glavni oblici su IgG, IgA i IgM. IgG, glavni oblik goveđeg mlijeka i kolostruma, postoji kao IgG1 i IgG2. Svaki oblik ima istu osnovnu strukturu, ali dok IgG postoji u monomernom obliku s molekularnom masom od oko 160 kDa, IgA postoji kao dimer (molekularne mase od oko 370 kDa), kao i tetramer, a IgM postoji kao pentamer s molekularnom masom od 900 -1000 kDa. Imunoglobulini su relativno stabilni pri zagrijavanju. Molekularne strukture imunoglobulina su vrlo složene (Deeth i Bansal, 2019).

#### 2.14.2. Funkcionalna svojstva proteina sirutke

Proteini sirutke koriste se u velikoj mjeri kao sastojak prehrambenih proizvoda zbog svojih jedinstvenih funkcionalnih karakteristika, kao što su emulgiranje, želiranje, ugušćivanje, pjenjenje te sposobnosti vezanja vode.

Sposobnost vezivanja vode vrlo je važno svojstvo u mljekarskoj industriji, odnosno u proizvodnji fermentiranih mliječnih napitaka te u pekarskoj industriji zbog održavanja svježine pekarskih proizvoda. Sposobnost vezivanja vode sirutkinih i denaturiranih sirutkinih proteina kreće se od 0,5 - 1,2 g H<sub>2</sub>O / 1 gramu suhe tvari. Proteini sirutke, zagrijavanjem pod određenim uvjetima otopine (pH, suha tvar, sastav mineralnih tvari) mogu formirati vrlo elastične gelove. Zagrijavanje je prvi korak u formiranju gela, a s porastom temperature, raste i stupanj intramolekularnog vezivanja te se stvara čvršći gel. Na topljivost proteina sirutke u velikoj mjeri utječe pH i temperatura te veličina čestica. Topivost proteina je pri pH vrijednostima oko 7 vrlo dobra, a može se razlikovati ovisno o veličini i strukturi određenog proteina. Proteini sirutke djeluju kao dobro emulgirajuće sredstvo. Faktori koji utječu na emulgirajuće osobine slični su faktorima koji određuju formiranje pjene i uvjetovani su sustavom koji se koristi za emulgiranje, ionskom jačinom sredine i tipom proteina sirutke. S obzirom da su proteini sirutke vrlo topljivi u kiselim sredinama, oni će djelovati kao emulgatori i pri niskim pH vrijednostima, pri kojima je većina drugih proteina netopljiva. U pH području 4 do 5 (izoelektričnom) nije moguće formirati stabilne emulzije.  $\beta$ -laktoglobulin pokazuje izvrsna svojstva stvaranja gelova i pjenjenja te se može koristiti kao sredstvo za stabiliziranje i teksturiranje mliječnih proizvoda (Peters, 2016; Nastaj i Sołowiej, 2020).

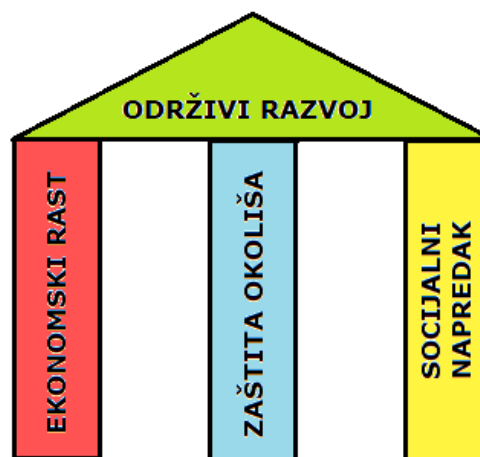
#### 2.14.3. Iskorištenje proteina sirutke

Sirutka se danas uglavnom prerađuje u koncentrate proteina sirutke ili izolate proteina sirutke, sirutku u prahu, stočnu hranu, laktozu i albuminski sir. Zbog velikog udjela vode najprihvatljivija alternativa je prerada sirutke u različite napitke. Tako je do danas razvijena čitava paleta sirutkinih napitaka, bilo da su proizvedeni od slatke ili kisele sirutke, od deproteinizirane sirutke, zatim od svježije sirutke razrijeđene vodom, fermentirane sirutke, pa sve do napitaka u prahu uz dodatak raznih aroma. Sirutka je i dobra podloga za rast mnogih vrsta mikroorganizama te može biti sirovina i za pripravu probiotičkih fermentiranih napitaka koji su hranjivo vrijedniji od običnih sokova. Osim toga sirutka može služiti i kao supstrat za proizvodnju mliječne kiseline i bioetanolu (Matijević, 2018). U mljekarstvu se sirutkini proteini najčešće koriste za proizvodnju sladoleda, jogurta i čokoladnih napitaka. Sirutka u prahu,

koncentrati i izolati sirutkinih proteina mogu se koristiti u proizvodnji sladoleda mijenjajući obrano mlijeko u prahu (Krolczyk i sur., 2016).

## 2.15. ODRŽIVOST I HRANA NA BAZI PROTEINA IZ BILJNOG IZVORA

Sva razvijena gospodarstva uključujući i europsko gospodarstvo nastoje u što većoj mjeri uvesti model održivog razvoja (*eng. sustainable development*). Koncept održivog razvoja svoj formalan početak ima u World Conservation Strategy iz 1980. godine, ali se njegova razrada i popularizacija veže uz 1987. godinu i Brundtlandovo izvješće poznato pod nazivom „Naša zajednička budućnost“ (*eng. Our Common Future*) te uz razvoj Svjetske komisije za okoliš i razvoj (*eng. World Commission on Environment and Development – WCED*). Održivi razvoj definiran je trima glavnim komponentama (Slika 14): 1. ekonomskom komponentom, koja se temelji na tome da je potrebno osigurati vlastiti gospodarski razvoj, 2. ekološkom komponentom koja ima fokus na održivosti budućeg razvoja i smanjenju zagađenja okoliša i 3. socijalnom komponentom koja se fokusira na osiguranje pravilne kohezije u društvu. Kao model gospodarstva, održivim razvojem potrebno je zadovoljiti potrebe sadašnje generacije, ali pri tome paziti da se ne ugroze mogućnosti ostvarivanja istih ciljeva u budućnosti. Odnosno, to bi značilo da je potrebno trošiti samo onoliko resursa koliko se može supstituirati te je potrebno staviti fokus na razinu zagađenja koju okoliš može prihvatiti (Frajman-Jakšić i sur., 2010).



**Slika 14.** Stupovi održivog razvoja (Prilagođeno prema Adams, 2006)

Ono što je bilo presudno za globalno prihvaćanje koncepta održivog razvoja bila je konferencija Ujedinjenih naroda (UN) o okolišu i održivom razvoju, održana 1992. godine u Rio de Janeiru, poznata pod nazivom „Earth Summit“. Na konferenciji je definiran smisao izraza „održivi razvoj“ kao usklađenost gospodarskog rasta, s jedne strane, i racionalnog korištenja prirodnih



resursa, s druge strane. Jedan od rezultata te konferencije bila je *Agenda 21* (program za 21. stoljeće) koja predstavlja globalni plan kako razvoj učiniti ekološki, gospodarski i društveno održivim (Frajman-Jakšić i sur., 2010). 2015. godine je u New Yorku održan sastanak UN-a o održivom razvoju na kojem je predstavljen novi program UN-a o održivom razvoju do 2030. godine (tzv. Agenda 2030). Glavnu okosnicu ove agende čine 17 ciljeva održivog razvoja i 169 detaljno razrađenih pod-ciljeva. Fokus ove agende je na iskorjenjivanju svih oblika i dimenzija siromaštva, uključujući i ekstremno siromaštvo što se smatra najvećim globalnim izazovom i osnovnim preduvjetom održivog razvoja (Ministarstvo vanjskih i europskih poslova, 2015).

Danas znamo da pored toga što utječe na povećanu potrošnju prirodnih izvora te doprinosi različitim oblicima zagađenja, ekonomska aktivnost također omogućava rješavanje tih problema. Da bi se zaustavili negativni učinci ekonomske politike na stanje okoliša, trebaju se stvarati takvi uvjeti koji bi u proces odlučivanja od samog početka uključivali kriterije vezane uz stanje okoliša. Nakon utvrđivanja prioriteta zaštite okoliša, vlade bi trebale formulirati ekonomsku politiku koja će gospodarstvo usmjeravati prema održivom razvitku, imajući na umu ekonomske, društvene i ekološke ciljeve (Roorda i sur., 2017).

Povećanje broja stanovništva, procvat ekonomije, brza urbanizacija i porast životnog standarda zajednice uvelike su ubrzali stvaranje čvrstog otpada u svijetu, posebno u zemljama u razvoju. Čvrsti otpad postao je jedno od globalnih pitanja zaštite okoliša. U 2011. godini globalna količina čvrstog otpada bila je procijenjena na oko 11 milijardi tona godišnje, a po glavi stanovnika u svijetu to bi iznosilo oko otprilike 1,74 tona godišnje. S druge strane, zajedno s velikim stvaranjem čvrstog otpada, svakodnevno se iscrpljuje enormna količina prirodnih resursa zbog velike potražnje za novim proizvodima. Globalno se godišnje potroši 120-130 milijardi tona prirodnih resursa i proizvede oko 3,4 do 4 milijarde tona komunalnog čvrstog otpada. Stvaranje bilo kakvog otpada iscrpljuje prirodne resurse, koristi energiju i vodu, vrši pritisak na zemlju, zagađuje okoliš i, konačno, stvara dodatne ekonomske troškove za gospodarenje otpadom. Ova velika količina otpada također je stvorila ogroman pritisak na vlasti da održivije upravlja otpadom. Osim toga, industrijalizacija je uvela velik broj proizvoda koje priroda ne može, ili ih može vrlo sporo, razgraditi ili probaviti. Stoga, određeni industrijski proizvodi sadrže tvari koje se, zbog niske razgradivosti ili čak otrovnih karakteristika, mogu u prirodi nakupljati do razina koje predstavljaju prijetnju za buduću upotrebu prirodnih resursa - to jest pitke vode, poljoprivrednog tla, zraka i slično. Posljednjih godina jedan od načina koji se predlaže kao način rješavanja ovih zabrinutosti jest koncept — "Zero Waste". To je koncept kojim se nastoji promijeniti dosadašnji ciklus proizvoda na način da se svi proizvodi recikliraju

te da se smanji količina otpada koji će se slati na odlagališta i u spalionice. Ovaj postupak nastoji imitirati postupak koji se odvija s obnovljivim prirodnim resursima. U sustavu bez otpada protok materijala ide u krug, što znači da se isti materijali koriste iznova i iznova dokle god imaju mogućnost iskorištenja. Stoga se na kraju svog ciklusa proizvodi ponovno koriste, popravljaju, prodaju ili preraspodjeljuju unutar sustava. Ako ponovna upotreba ili popravci nisu mogući, mogu se reciklirati i koristiti kao ulazni materijal, zamjenjujući potražnju za korištenjem prirodnih resursa (Song i sur., 2014; Kumar i sur., 2021).

Koncept "Zero Waste" može se povezati s pravilom "Three Rs" odnosno "Tri R" što se odnosi na "Reduce, Reuse, Recycle" što u prijevodu znači "Smanji potrošnju, Ponovno iskoristi, Recikliraj" čime se također potiče ekološka svijest i čime se promiče svjesno ponašanje i izbor potrošača i proizvođača. Prehrambena industrija se vodi navedenim konceptima i pravilima te se danas na policama mogu pronaći ambalaže koje se mogu lakše reciklirati ili pak ambalaže od recikliranom materijala (Abdul-Rahman, 2014). Osim toga, ono što je puno zanimljivije i što se istražuje i na čemu se radi zadnjih nekoliko godina je kako iskoristiti otpad koji nastaje prehrambenoj industriji kako bi se od njega stvorili novi prehrambeni proizvodi. Nusproizvodi u proizvodnji i preradi raznog voća, povrća, žitarica i drugih proizvoda su uglavnom dijelovi koji nisu jestivi kao što su ljuske, kore, koštice, stabljike, listovi i slično. No istraživanjima se utvrdilo da su baš ti dijelovi bogati antioksidansima, vitaminima, mineralima, vlaknima, proteinima i mnogim drugim makro i mikromolekulama koje imaju pozitivan utjecaj na ljudski organizam. Nutritivno bogatstvo nusproizvoda mora postati poticaj prehrambenoj industriji za iskorištavanje nusproizvoda u proizvodnji nekih drugih, nutritivno bogatih proizvoda, dodataka prehrani ili poticaj za iskorištavanje tih nusproizvoda za obogaćivanje postojećih prehrambenih proizvoda. Na taj način bi se svaki dio određenog proizvoda mogao iskoristiti u proizvodnji novog proizvoda, ne nužno prehrambenog, a primjer iskorištavanja biljke u raznim industrijama je konoplja. Konoplja se u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji može iskoristiti na primjer za proizvodnju konopljinog ulja, ulja obogaćenog CBD-om, proteinskog praha, konopljinog čaja, konopljinog keksa, napitaka, gelova, krema, masti, losiona i šampona na bazi konoplje, u tekstilnoj industriji se konoplja može iskoristiti u proizvodnji tekstila i konopa, u autoindustriji može se koristiti za izradu kočnog mehanizma i unutrašnjih obloga za automobile, u građevinskoj industriji se može iskoristiti za proizvodnju izolacijskog materijala ili prilikom proizvodnje lakih vrsta betona te u još mnogo toga. Ovakav način iskorištavanja biljnog materijala i njenog nusproizvoda mora postati primjer za svaku tvrtku u prehrambenoj industriji, jer se jedino na taj način može smanjiti količina otpada, povećati održivi razvoj

prehrambene proizvodnje, smanjiti količina masovnog iskorištavanja bioloških resursa, smanjiti količina negativnog utjecaja na okoliš (Karche i Singh, 2019; Fike, 2016).

Proizvodnja hrane je proces koji značajno utječe na promjenu klime. Poljoprivredna proizvodnja odgovorna je za nastajanje čak 17-32% ukupne emisije stakleničkih plinova, a u tome najveću odgovornost ima sektor stočarstva, proizvodnja mesa i mlijeka te proizvodnja proizvoda od mlijeka i mesa. Razvoj održive poljoprivrede i prehrambene industrije su esencijalni elementi dugoročnog ekonomskog plana i plana zaštite životne sredine svake države. Poljoprivreda, proizvodnja i potrošnja hrane vjerojatno su neki od najvažnijih pokretača ekoloških opterećenja, kao što su promjena staništa i gubitak biološke raznolikosti, iskorištavanje zemljišta i degradacija tla, klimatske promjene, zagađenje vode, nestašica vode i otrovne emisije (Notarnicola i sur., 2015).

Relativno niska učinkovitost proizvodnje životinjskog mesa, negativan utjecaj mesnih prerađevina na zdravlje, negativan utjecaj na okoliš povezan s uzgojem životinja i dobrobit životinja glavne su pokretačke snage za tržište biljnih proizvoda u zamjenu za meso. Prilikom stvaranja mesnih alternativa nastoji se stvoriti tekstura što sličnija životinjskom mesu, odnosno životinjskom mišiću, a uz to se nastoji postići što sličniji okus i izgled tog mesa te se žele rekonstruirati proizvodi koji oponašaju prerađeno meso kao što su pljeskavice, kobasice, medaljoni i tome slični proizvodi. Proizvodi nalik mesu se mogu klasificirati kao proizvodi na bazi biljaka (plant-based) ukoliko su npr. napravljeni od soje, graška, glutena itd. ili kao proizvodi nastali fermentacijom ukoliko se koriste na primjer mikoproteini. Proteini sintetizirani *in vitro* i mikoproteini proizvedeni fermentacijom gljiva imaju prednost stvaranja izduženih vlakana. Nitasti protein micelija daje žvakaće karakteristike nalik mesu i smatra se korisnim za zdravlje. Međutim, zbog visokih proizvodnih troškova, predviđenih klimatskih utjecaja i drugih čimbenika oba su alternativna proteina još uvijek u fazi razvoja ili daljnjeg poboljšanja. Za usporedbu, biljni proteini se mogu izravno koristiti za stvaranje alternativa sličnih mesu. Stoga biljne alternative mesu predstavljaju primarnu opciju ovoj industriji koja se brzo razvija. Kao „zamjene“ za tradicionalne prehrambene proizvode životinjskog podrijetla, oni se često plasiraju kao „zdravija“ (od mesa) i održiva nova hrana (Sha i Xiong, 2020).

Srž razvoja biljnih alternativa su proteini. Razni funkcionalni sastojci su također potrebni za stvaranje i oponašanje teksture, izgleda, osjećaja u ustima i okusa proizvoda na bazi proteina. Stvaranje vlaknastih struktura nalik mesu podrazumijeva intenzivnu obradu, na primjer, smicanje, pređenje i umrežavanje. Ti procesi omogućuju transformaciju nativnih struktura proteina u denaturirani oblik kako bi se omogućila interakcija između proteina i polimera

ugljikohidrata. S druge strane, crveni pigmenti dodaju se za postizanje boje slične mesu, a dodaju se različiti vitamini i minerali kako bi se uspostavila hranjiva razina usporediva s mesom. Unatoč zapaženom početnom uspjehu, pred proizvodima "biljnog mesa" stoje izazovi. Osim tehnoloških prepreka oponašanja teksture i okusa mesa, sigurnost hrane i nutritivni sastav predstavljaju prepreke koje nisu adekvatno riješene. Na primjer, iskorištavanje široko dostupnih, ali alergeni biljnih proteina, dodavanje raznih sastojaka i aditiva kako bi se stvorile osjetilne karakteristike nalik mesu, potencijalne štetne promjene za spojeve osjetljive na toplinu i moguće mikrobiološko onečišćenje, sve su to postupci koji moraju biti dodatno istraženi (Sha i Xiong, 2020).

Na poljoprivredu životinja otpada 37%, 65%, odnosno 64% antropogenih emisija metana, dušikovog oksida i amonijaka, fermentacijom preživača, otpadom stoke, upotrebom gnojiva i drugim čimbenicima. Metan i dušikov oksid imaju 23, odnosno 296 puta veći potencijal poticanja globalnog zatopljenja od ugljikovog dioksida. 2006. godine FAO je izjavila da poljoprivreda životinja proizvede 18% godišnjih antropogenih emisija stakleničkih plinova, mjenjenih u ekvivalentima CO<sub>2</sub>, što je više nego što je slučaj u svjetskom prometnom sektoru. Životinjska poljoprivreda čini 30% ukupne površine zemljišta, a 33% obradivih površina koristi se za proizvodnju krmnih biljaka, s uloženom energijom koja je daleko veća od proizvodnje. Otprilike 70% prethodno pošumljenog zemljišta u latinoameričkoj Amazoniji koristi se kao pašnjaci za ispašu, dok se ostatak uglavnom koristi za proizvodnju krmnih usjeva. Godišnje se u Sjedinjenim Američkim Državama koristi 45 milijuna tona biljnih proteina za proizvodnju 7,5 milijuna tona životinjskih proteina. Većinu ovih biljnih proteina ljudi bi mogli izravno konzumirati, a dijelom bi moglo ublažiti rastuću zabrinutost zbog globalne nestašice hrane (Karwacka i sur., 2020).

Stočarstvo osim što ima negativan utjecaj na povećanje stakleničkih plinova, troši i 70% slatke vode i znatno pridonosi onečišćenju zemljišta, zraka i vode. Pesticidi i gnojiva, uključujući stajski gnoj, mogu kontaminirati plovne putove. U SAD-u je poljoprivreda životinja odgovorna za 37% upotrebe pesticida, odnosno 32% i 33% opterećenja dušikom i fosforom pronađenim u izvorima slatke vode. Istraživanja u Sjevernoj Karolini i Iowi utvrdila su znatan porast simptoma astme kod djece koja borave u blizini industrija uzgoja svinja i mjere smanjenje kvalitete života u okolnim zajednicama. Utjecaj poljoprivrede na okoliš naveo je FAO da 2006. godine izjavi da se „stočarski sektor ubraja kao jedan od dva ili tri najznačajnija izvora od kojih potječu najveći problemi vezani za zagađenje okoliša“ (Akhtar i sur., 2009). Za proizvodnju 1 kg životinjskih proteina potrebno je oko 100 puta više vode nego za proizvodnju 1 kg proteina

iz žitarica. Stoka izravno koristi samo 1,3% ukupne vode koja se koristi u poljoprivredi. Međutim, kada se uključi voda potrebna za proizvodnju žitarica i krmiva za prehranu životinja, potrebe za vodom za stočarstvo dramatično se povećavaju. Na primjer, za proizvodnju 1 kg svježeg govedine može biti potrebno oko 13 kg žita i 30 kg sijena. Toliko krme i žitarica zahtijeva oko 100 000 L vode za proizvodnju 100 kg sijena, a 5400 L za 4 kg žita. Na pašnjacima za proizvodnju krme potrebno je više od 200 000 L vode za proizvodnju 1 kg govedine (Pimentel i Pimentel, 2003).

S obzirom na sve spomenute negativne strane stočarstva, prehrambena industrija trebala bi se okrenuti „plant based“ prehrani, zamjeni životinjskih proizvoda biljnim, iskorištavanju svih blagodatnih biljaka i svih dijelova pojedine biljke. Zadnjih nekoliko godina provode se brojna istraživanja kojima se ispituju razni biljni proizvodi, njihova svojstva, količina mikro i makromolekula koje bi se mogle iskoristiti u budućim proizvodima. Razne biljne vrste kao što su žitarice i mahunarke sadrže velike količine proteina što je fokus mnogih pa tako i ovog istraživanja. Proteini biljaka mogu se koristiti u proizvodnji raznih proizvoda zahvaljujući svojim funkcionalnim svojstvima, mogu se koristiti kako bi obogatili razne prehrambene proizvode, mogu se također izolirati i prodavati u obliku izolata, koncentrata i proteinskih prahova koji bi se koristili kao dodatak prehrani i slično tome. Ukoliko bi se prehrambena industrija osvijestila i zakoračila prema iskorištavanju brojnih mogućnosti koje joj nude nusproizvodi koje je do sada odbacivala, kada bi se fokusirali na proizvodnju proizvoda na bazi bilja i proizvoda obogaćenih biljnim komponentama, tada bi napravili i ogroman korak ka spašavanju okoliša, smanjenju zagađenja i povećanju kvalitete života (Sha i Xiong, 2020; Balandra'n-Quintana i sur., 2019).

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Pribor i aparatura

- Automatska pipeta
- Falcon epruvete (50ml)
- Kvarcne kivete
- Menzure (100 ml)
- Omega kivete
- Pipeta (5 ml)
- Posuda za miješanje
- Staklene boce (100 ml, 1000 ml)
- Staklene čaše (50ml, 100ml)
- Staklene epruvete
- Staklene kivete
- Stakleni lijevci
- Šprice (5 ml)
- Tikvice (10 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml)
- Žlice
- Analitička vaga (NBL-254i, Nimbus Analytical Balances, Oxford, SAD)
- Centrifuga (Rotina 35, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka)
- Električni mikser (Delimano, Family magic mix, Ljubljana, Slovenija)
- Fluorimetar (LS 55, PerkinElmer, Waltham, SAD)
- Magnetska miješalica (Dlab, MS-H-S, Peking, Kina)
- Program za analize na fluorimetru (FL WinLab, PerkinElmer, Waltham, SAD)
- Program za analizu čestica (Kalliope, Anton Paar, Graz, Austrija)
- Uređaj za analizu čestica (Litesizer 500, Anton Paar, Graz, Austrija)
- UV/VIS spektrofotometar (Lambda 25, PerkinElmer, Waltham, SAD)
- Vortex tresilica (Dlab, MX-S, Peking, Kina)

### 3.1.2. Kemikalije

- Bakrov sulfat pentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Destilirana voda
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Goveđi serumski albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Kalij, natrij-tartarat (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Natrijev 1-anilinonafteln-8-sulfonat (ANS-Na) (abcr, Karlsruhe, Njemačka)
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid (NaOH) (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Suncokretovo ulje (Zvijezda plus, Zagreb, Hrvatska)
- Toluen (E. Merck, Darmstadt, Njemačka)

### 3.1.3. Uzorci

U svrhu ovog rada korišteno je 5 uzoraka proteina te nusproizvod kave, tj. pokožica kave kao nusproizvod bogat proteinima.

Rižin protein, brand Nutrigold (Galleria Internazionale d.o.o., Zagreb, Hrvatska). Količina bjelančevina na 100 g proizvoda iznosi 83 g, a ostatak čine masti (4,5 g/100 g), ugljikohidrati (2,9 g/100 g) te sol (<0,05 g/100 g).

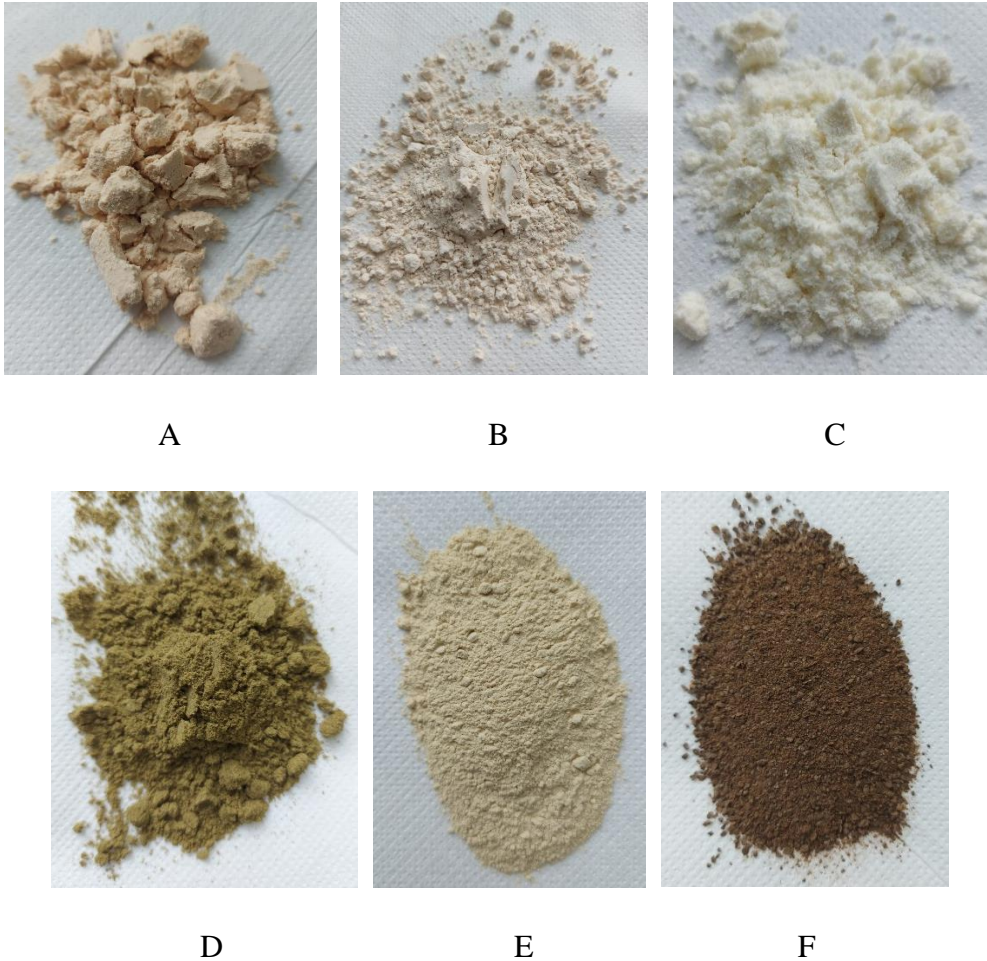
Protein graška, brand Nutrigold (Galleria Internazionale d.o.o., Zagreb, Hrvatska). Količina bjelančevina na 100 g proizvoda iznosi 80 g, a ostatak čine masti (4,1 g/100 g), ugljikohidrati (0,5 g/100 g) te sol (<0,05 g/100 g).

Protein sirutke, brand Nutrigold (Galleria Internazionale d.o.o., Zagreb, Hrvatska). Količina bjelančevina na 100 g proizvoda iznosi 81,2 g, a ostatak čine masti (5,3 g/100 g), ugljikohidrati (6,5 g/100 g) te sol (0,75 g/100 g).

Konopljin proteinski prah nabavljen je od hrvatskog proizvođača Nutri Oil d.o.o., Velika Gorica, Hrvatska. Količina bjelančevina na 100 g proizvoda iznosi 50,68 g, a ostatak čine masti (9,56 g/100 g), ugljikohidrati (5,85 g/100 g), vlakna (24,38 g/100 g).

Izolat proteina boba dobiven je od partnera NutriS d.o.o., Novi Senkovac, Hrvatska. Koncentracija proteina u dobivenom uzorku je prema prethodnim analizama veća od 85%, a ostatak čine škrob (<10%), vlakna (<5,0%), pepeo (<3,5%).

Uzorci pokožice kave dobiveni su od hrvatske firme Franck d.d. u obliku briketa koji su za potrebe istraživanja mljeveni u prah.



**Slika 15.** Prikaz uzoraka korištenih u ovome radu; a) protein graška, b) protein riže, c) protein sirutke, d) proteinski prah konoplje, e) protein boba, f) srebrna pokožica kave (Vlastite fotografije)



## 3.2. METODE

### 3.2.1. Određivanje ukupnih proteina metodom po Lowryju

Kako bi se mogla odrediti koncentracija nekog proteina, potrebno je najprije izraditi baždarni dijagram, odnosno dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina. Najprije se pripremaju otopine reagensa A, B i C, Folin-Ciocalteu reagens te otopine proteina u rasponu koncentracija od 0,02 – 0,1 mg/ml. Reagens A priprema se od 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 0,1 M NaOH. Reagens B priprema se od 0,5%  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  u 1% K,Na-tartaratu. Reagens C priprema se tako da se pomiješa 50 ml reagensa A i 1 ml reagensa B. Folin-Ciocalteu reagens komercijalni je reagens koji se razrijedi s destiliranom vodom u omjeru 1:2.

U staklene epruvete doda se 0,8 ml otopine proteina te se doda 4 ml reagensa C i miješa protresivanjem te se ostavi na sobnoj temperaturi 10 do 15 minuta. Nakon toga, naglo se dodaje Folin-Ciocalteu reagens i snažno se promiješa na vortex tresilici (Dlab, MX-S, Peking, Kina) te se ostavi na sobnoj temperaturi 40 do 60 minuta. Nakon toga mjeri se apsorbancija na UV/VIS spektrofotometru (Lambda 25, PerkinElmer, Waltham, SAD) (Slika 16) na 740 nm.



**Slika 16.** UV/VIS spektrofotometar (Lambda 25, PerkinElmer, Waltham, SAD) korišten za određivanje ukupnih proteina i emulgirajućih svojstava (Vlastita fotografija)

### 3.2.2. Određivanje veličine čestica

Veličina čestica u otopinama proteina analizirana je pomoću uređaja Litesizer 500 (Anton Paar GmbH, Graz, Austrija) (Slika 17) i prema uputama proizvođača. Uzorci proteina najprije su pripremljeni kao 1%-tne otopine (0,5 g u 50 ml) s destiliranom vodom. Prije mjerenja miješani su na magnetskoj miješalici kako bi se prilikom prenošenja uzorka u staklenu kivetu uzeo što

bolje izmiješan uzorak. Mjerenja su provedena u paralelama na temperaturama 20°C i 30°C, a kut mjerenja uređaj odabire automatski. Mjerenje i analiza rezultata provedena je u programu Kalliope (Anton Paar, Graz, Austrija).

### 3.2.3. Određivanje molekularne mase

Postupak određivanja molekularne mase u uzorcima proveden je prema uputama proizvođača. Najprije je potrebno svaki uzorak proteina pripremiti u koncentracijama 0,2%, 0,6% i 1%, odnosno 2 mg/ml, 6 mg/ml i 10 mg/ml. Za izvođenje mjerenja su nam također bili potrebni otapalo (destilirana voda) i referentni uzorak, u ovom slučaju toluen. Svaki je uzorak prije mjerenja miješan na magnetskoj miješalici kako bi bio potpuno izmiješan prilikom umetanja u uređaj za mjerenje. Mjerenje je provedeno na temperaturi od 20°C u staklenoj kivetu pomoću uređaja za analizu čestica, Litesizer 500 (Slika 17). Mjerenje i analiza rezultata provedena je u programu Kalliope.

### 3.2.4. Određivanje svojstava pjenjenja proteina

Ovom je metodom cilj odrediti sposobnost stvaranja pjene te odrediti stabilnost stvorene pjene. Najprije se određuje *povećanje volumena pjene* na način da se pripremi 100 ml 10%-tne suspenzije koja se zatim miješa mikserom 15 minuta na najvećoj brzini. U intervalima od po 5 minuta uzima se 100 ml pjene koja se zatim izvaže. Nakon vaganja pjena se vraća u posudu te se nastavlja miješati dok se ne izvrše tri uzastopna mjerenja (nakon 5, 10 i 15 minuta) (Webb i sur., 2002). Nakon što se izvrše mjerenja, postotak povećanja volumena računa se formulom:

$$\% \text{ povećanja} = \frac{m(100 \text{ ml suspenzije proteina}) - m(100 \text{ ml pjene})}{m(100 \text{ ml pjene})} * 100 \quad /1/$$

Stabilnost pjene mjeri se tako da se pripremi 100 ml 10%-tne suspenzije proteina koja se miješa 15-30 minuta mikserom na najvećoj brzini. Nakon miješanja u čašu se stavi 100 ml pjene koja se prebaci u stakleni lijevak koji je uronjen u menzuru od 100 ml i ostavi se na sobnoj temperaturi 15 minuta. Nakon 15 minuta odredi se količina izdvojene tekućine prema formuli:

$$M_t = (m_{li} + m_{mt}) - (m_m + m_{li}) \quad /2/$$

Pri čemu je:

$m_t$  – masa ocijedene tekućine iz pjene

$m_{li}$  – masa lijevka

$m_{mt}$  – masa menzure s ocijedenom tekućinom

$m_m$  – masa menzure

Nakon što se izlije pjena u stakleni lijevak, zabilježi se vrijeme kada je pala prva kap tekućine te je time određen *indeks stabilnosti pjene*, a vrijeme potrebno da se ocijedi sva pjena daje podatak o *minimalnoj stabilnosti pjene*. Za ispitivanje svojstava pjenjenja svi uzorci mjereni su u dvije paralele (Morr i Foegeding, 1990).

### 3.2.5. Određivanje svojstava emulgiranja proteina

Postupak određivanja svojstava emulgiranja proteina zasniva se na mjerenju apsorbancije emulzije na UV/VIS spektrofotometru (Slika 16), na temelju koje se izračuna vrijednost mutnoće (Webb i sur., 2002.).

Postupak:

Najprije je potrebno pripremiti 3%-tnu suspenziju proteina koja će se pomiješati sa suncokretovim uljem (Zvijezda plus d.o.o.) u omjeru 2:1. Slijedi miješanje s mikserom na najvećoj brzini 90 sekundi te se nakon toga pripremljenoj emulziji mjeri apsorbancija pri 500 nm u kiveti debljine 1 cm. Za ispitivanje svojstava emulgiranja svaki uzorak je ispitan u dvije paralele.

*Mutnoća* se računa iz izraza:

$$T = 2,303 * \frac{A}{I} \quad /3/$$

Pri čemu je:

T – mutnoća

A – apsorbancija kod 500 nm

I – debljina kivete

*Indeks aktiviteta emulzije* računa se iz izraza:

$$IAE = \frac{2 * T}{V_U * C} \quad /4/$$

Pri čemu je:

T – mutnoća

$V_U$  – volumni udio uljne faze

C – masa proteina u jedinici volumena vodene faze prije pripreme emulzije

Stabilnost emulzije određuje se tako da se pripremljena emulzija drži na 4°C 24 sata i tada se ponovo mjeri apsorbancija kod 500 nm te se ponovo računa mutnoća.

*Indeks stabilnosti emulzije* računa se iz izraza:

$$ISE = \left( \frac{T * \Delta t}{\Delta T} \right) \quad /5/$$

Pri čemu je:

T – mutnoća određena na početku

$\Delta T$  – promjena mutnoće za vrijeme od 24 sata

$\Delta t$  – vremenski interval

### 3.2.6. Određivanje kapaciteta vezanja vode i ulja

Za određivanje kapaciteta vezanja vode i ulja najprije je potrebno izvagati 0,05 g proteina u plastičnu kivetu te dodati 1,5 ml destilirane vode. Snažno izmućkati na vorteks tresilici 20 sekundi te ostaviti 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon 30 minuta uzorci se stavljaju u centrifugu na 8000 okretaja/min kroz 20 minuta. Nakon toga supernatant se odvaja, a kiveta s ostatkom se važe (Aydemir i Yemenicioglu, 2013). Kapacitet vezanja vode računa se iz izraza:

$$WHC/OHC = \frac{M_2 - M_1}{M_0} \quad /6/$$

Pri čemu je:

$M_1$  – kiveta sa suhim uzorkom

$M_2$  – kiveta s uzorkom nakon centrifuge

$M_0$  – masa uzorka

### 3.2.7. Određivanje zeta potencijala

Zeta potencijal otopina proteina analiziran je pomoću uređaja Litesizer 500 (Slika 17) i prema uputama proizvođača. Uzorci proteina najprije su pripremljeni kao 1%-tne otopine (0,5 g u 50

ml) s destiliranom vodom. Prije mjerenja miješani su na magnetskoj miješalici kako bi se prilikom prenošenja uzorka u Omega kivetu uzeo što bolje izmiješan uzorak. Mjerenje je provedeno korištenjem automatskog podešavanja napona i upadnog kuta zrake svjetlosti, a zeta potencijal je izračunat iz modela Smoluchowski. Mjerenja su provedena u pet paralela na sobnoj temperaturi te u dvije paralele na temperaturama od 20°C, 30°C, 40°C, 50°C i 60°C te su isti uzorci mjereni na istom rasponu temperatura nakon 24h. Mjerenje i analiza rezultata provedena je u programu Kalliope.



**Slika 17.** Uređaj za analizu čestica Litesizer 500 (Anton Paar GmbH, Graz, Austrija) (Vlastita fotografija)

### 3.2.8. Određivanje površinske hidrofobnosti proteina

Postupak određivanja hidrofobnosti proteina proveden je prema metodi upisanoj u radu Chaudhuri i sur. (1993.). Najprije je potrebno pripremiti fosfati pufer (0,1 M, pH=7,4), zatim su u tom puferu pripremaju otopine proteina i otopina ANS-a. ANS je pripremljen u koncentraciji 8 mM te je čuvan na sobnoj temperaturi zamotan u aluminijsku foliju. Proteini su najprije razrijeđeni na koncentraciju 1 mg/ml u staklenoj tikvici od 50 ml te su se iz te početne otopine razrijedili u 5 uzastopnih koncentracija od 0,15 - 0,35 mg/ml. Zatim se u 4 ml svake koncentracije proteina dodaje 20 µl ANS-a, otopina se izmiješa na vortex tresilici te se ostavi stajati u mraku 30 minuta. Nakon 30 minuta otopine se analiziraju na sobnoj temperaturi (25°C) na fluorimetru (valna duljina pobude je 390 nm, a valna duljina emisije je na 470 nm), a slitovi

se namještaju na način da intenzitet fluorescencije ulazi u granice mjernih sposobnosti instrumenta. Slitovi se namještaju za pobudu (Ex) i emisiju (Em). S obzirom na vrlo različite uzorke, slitovi su morali biti posebno namješteni za svaki uzorak, pa su tako za bob i rižu bili Ex: 3.0 nm, Em: 3.0 nm, za sirutku i grašak Ex: 4.0 nm, Em: 4.0 nm, za konoplju Ex: 5.0 nm, Em: 5.0 nm te za pokožicu kave Ex: 8.0 nm, Em: 8.0 nm. Osim otopina proteina, potrebno je snimiti i otopinu ANS-a na jednakim uvjetima. Mjerenja su provedena u programu FL WinLab (PerkinElmer, Waltham, SAD) i na fluorimetru (Slika 18). Analizom na fluorimetru dobivamo graf ovisnosti intenziteta fluorescencije o valnoj duljini. U ovom slučaju uzimaju se vrijednosti intenziteta kompleksa ANS-protein na 470 nm te intenzitet fluorescencije otopine ANS-a na istoj valnoj duljini, a one nam služe za crtanje grafa ovisnosti relativne frekvencije o koncentraciji proteina za koji nam je potreban sljedeća jednadžba:

$$F_R = \frac{F - F_0}{F_0} \quad /7/$$

Pri čemu je:

$F_R$  – relativna frekvencija

$F$  – intenzitet fluorescencije kompleksa protein-ANS

$F_0$  – intenzitet fluorescencije otopine ANS-a



**Slika 18.** Fluorimetar (LS 55, PerkinElmer, Waltham, SAD) korišten za analizu hidrofobnosti površine proteina (Vlastita fotografija)

Iz grafova ovisnosti relativnog intenziteta fluorescencije o valnoj duljini uzorka, uzimaju se vrijednosti intenziteta fluorescencije na 470 nm, valnoj duljini emisije, te se s tim veličinama izradi novi graf ovisnosti intenziteta frekvencije o koncentraciji na način da se provede linearna

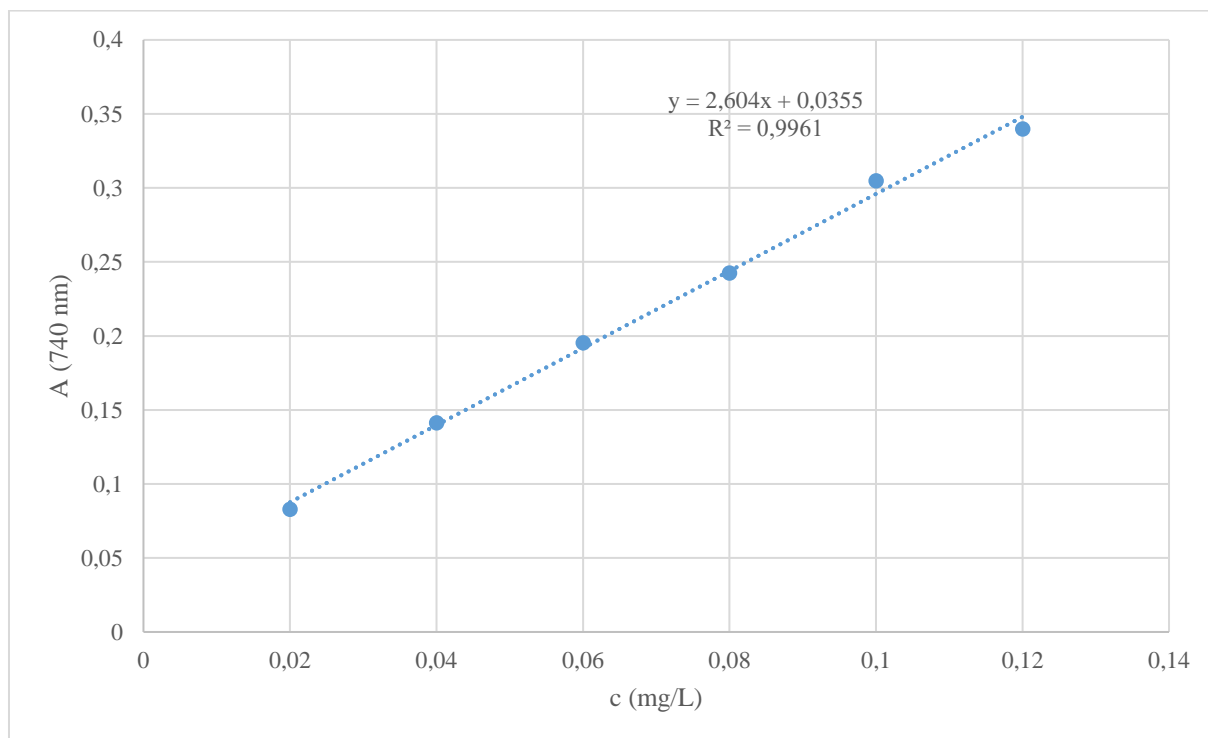
regresija i izvede jednadžba pravca. Koeficijent smjera, odnosno nagib pravca uzima se kao vrijednost površinske hidrofobnosti.

### 3.2.9. Statistička analiza podataka

Statistička analiza podataka (ANOVA) provedena je u programu MS Excel 365 kako bi se utvrdila statistička značajnost rezultata između proteina. Analiza kovarijance (ANCOVA test) i linearna regresija provedene su u programu XL Stat (MS Excel 2010) kako bi se utvrdile razlike rezultata u odnosu na sirutku kao referentni uzorak.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Količina proteina



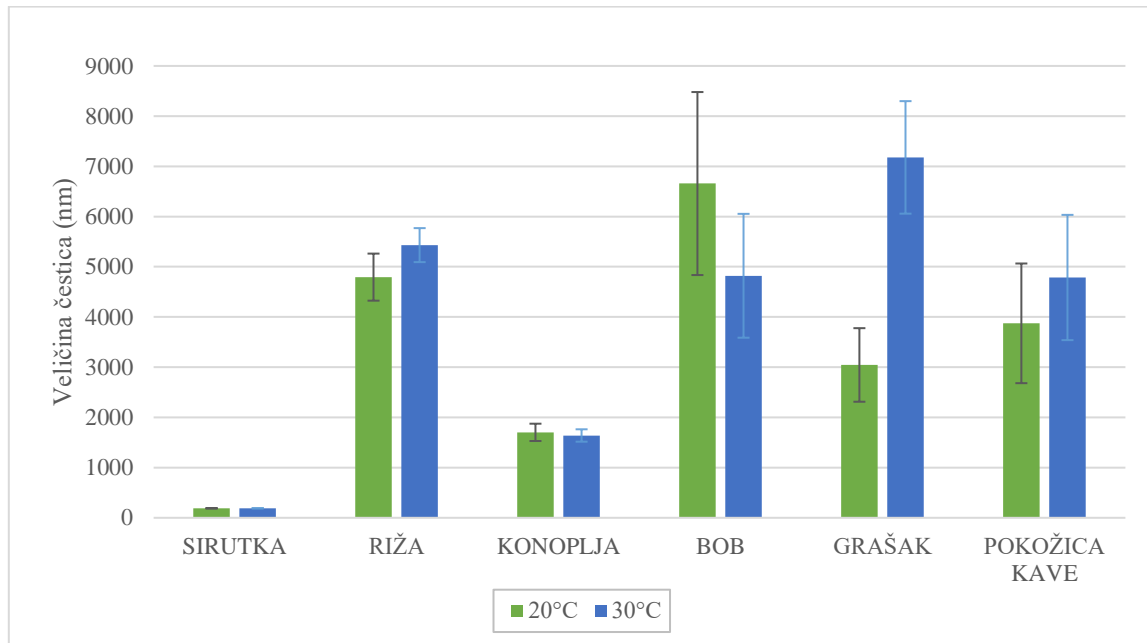
**Slika 19.** Baždarni pravac napravljen od standarda BSA u svrhu određivanja količine proteina

**Tablica 2.** Rezultati količine proteina određene u uzorcima

<b>UZORAK</b>	<b>KONCENTRACIJA (mg/g)</b>
<b><i>BOB</i></b>	0,536±0,013
<b><i>SIRUTKA</i></b>	0,464±0,036
<b><i>GRAŠAK</i></b>	0,384±0,055
<b><i>RIŽA</i></b>	0,196±0,011
<b><i>KONOPLJA</i></b>	0,109±0,024
<b><i>POKOŽICA KAVE</i></b>	0,010±0,003



#### 4.2. Veličina čestica



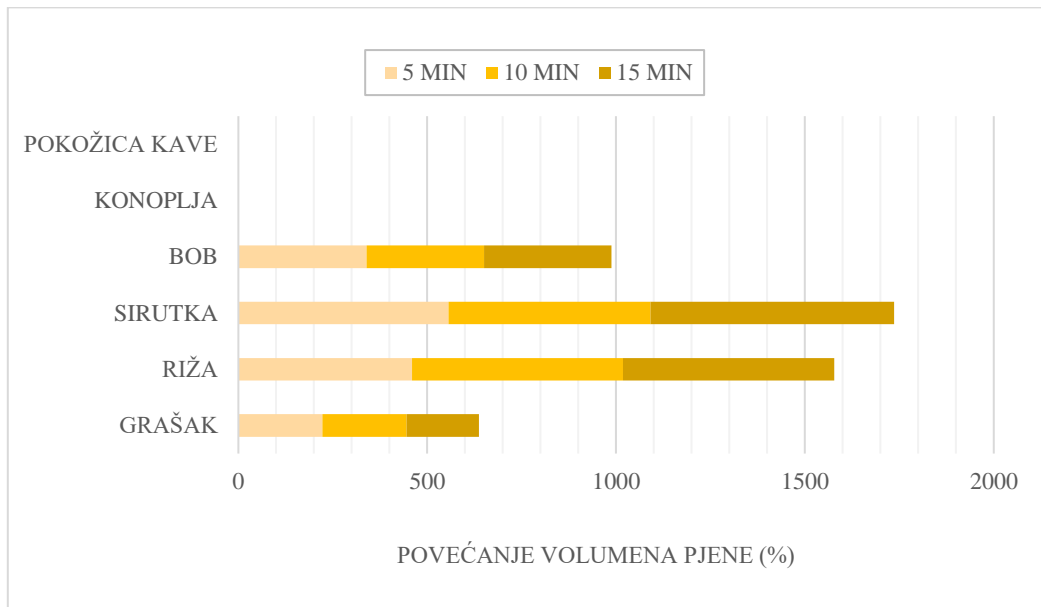
**Slika 20.** Veličina čestica otopina proteina na temperaturama 20°C i 30°C

#### 4.3. Molekularna masa

**Tablica 3.** Rezultati ukupne molekularne mase u vodenim otopinama uzoraka proteina

<b>UZORAK</b>	<b>MOLEKULARNA MASA (kDa)</b>	<b>Drugi virijalni koeficijent (mol ml g<sup>-2</sup>)</b>
<i>RIŽA</i>	13460,00±3213,60	7,510×10 <sup>-5</sup>
<i>GRAŠAK</i>	1433,33±184,45	6,623×10 <sup>-5</sup>
<i>SIRUTKA</i>	332,33±4,78	1,132×10 <sup>-5</sup>
<i>KONOPLJA</i>	321,00±85,96	-3,313×10 <sup>-4</sup>
<i>BOB</i>	176,33±36,61	-3,567×10 <sup>-6</sup>
<i>POKOŽICA KAVE</i>	64,93±13,63	-9,589×10 <sup>-5</sup>

#### 4.4. Svojstva pjenjenja

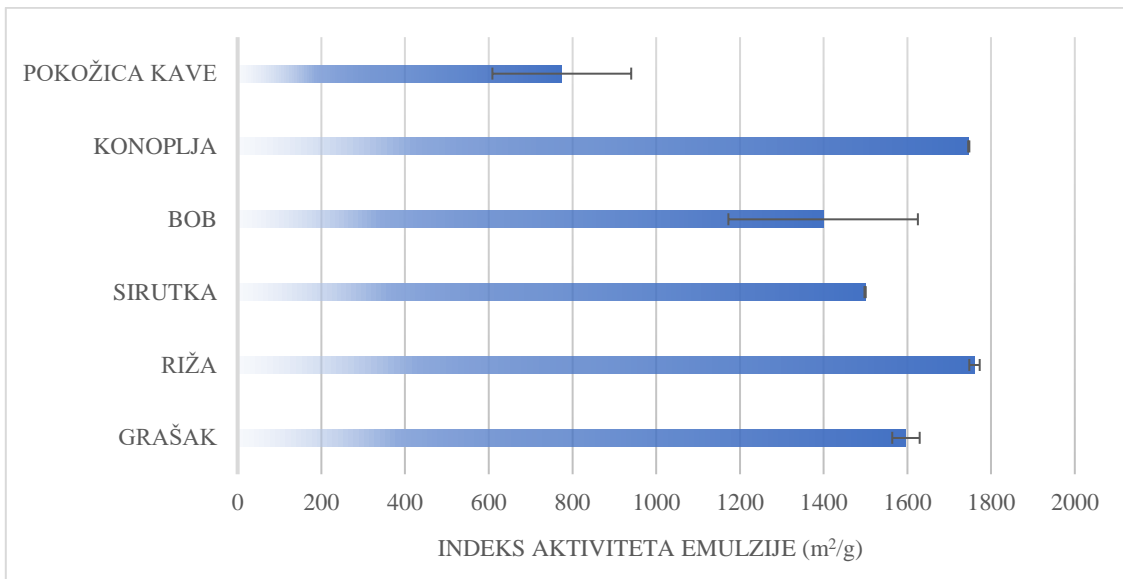


**Slika 21.** Postotak povećanja volumena pjene u uzorcima nakon 5, 10 i 15 minuta

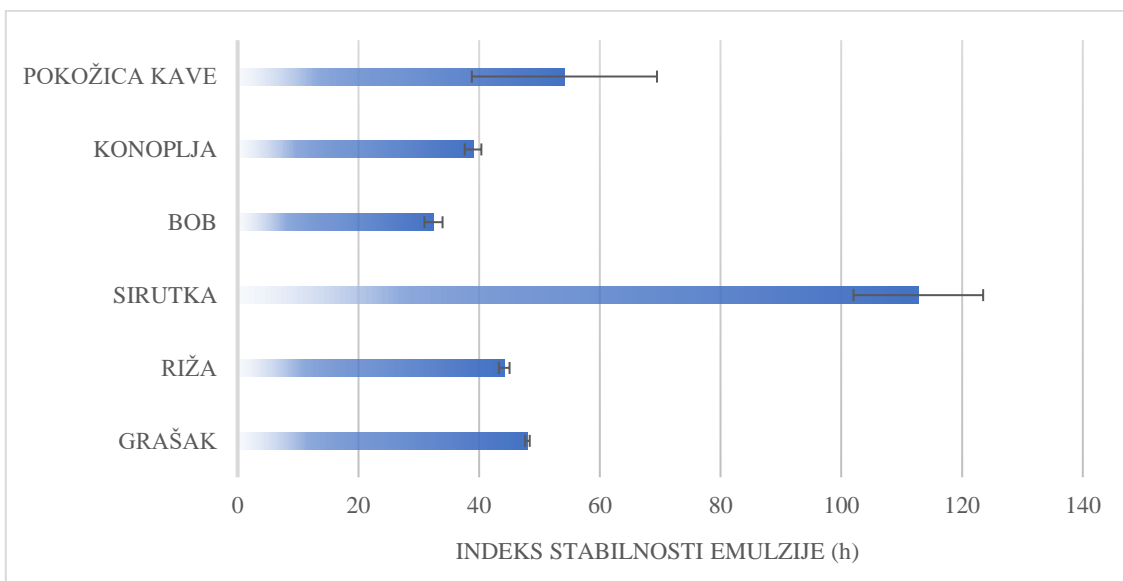
**Tablica 4.** Rezultati indeksa stabilnosti pjenjenja (ISP) i maksimalne stabilnosti pjenjenja (MSP)

UZORAK	ISP (s)	MSP (min)
<b>GRAŠAK</b>	1,43±0,14	7,30±0,20
<b>RIŽA</b>	0,00±0,00	153,30±0,01
<b>SIRUTKA</b>	38,00±3,00	7,99±0,19
<b>BOB</b>	0,00±0,00	4,13±0,37

#### 4.5. Svojstva emulgiranja



**Slika 22.** Rezultati indeksa aktiviteta emulzije za svaki uzorak

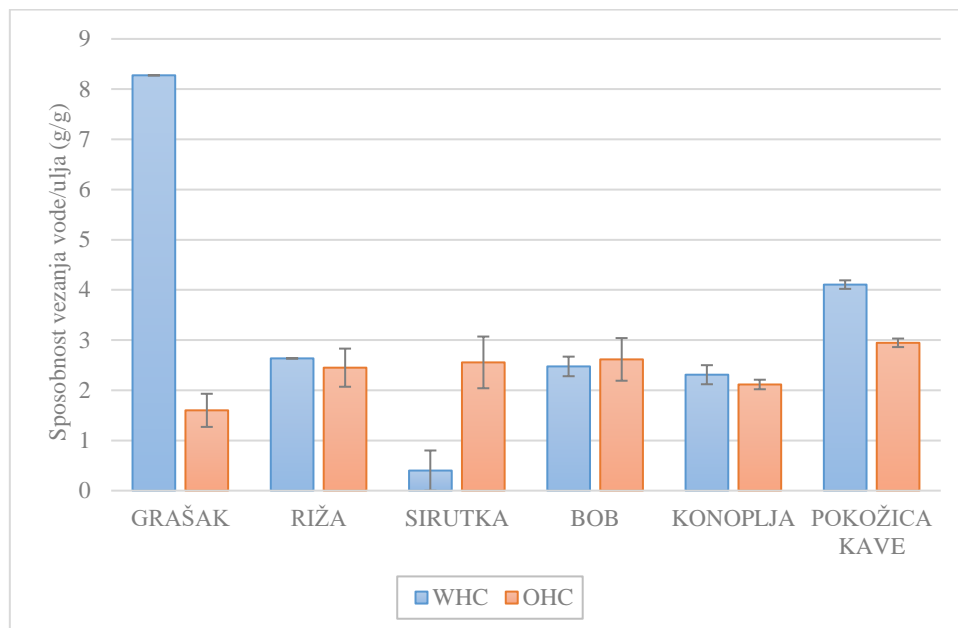


**Slika 23.** Rezultati indeksa stabilnosti emulzije za svaki uzorak



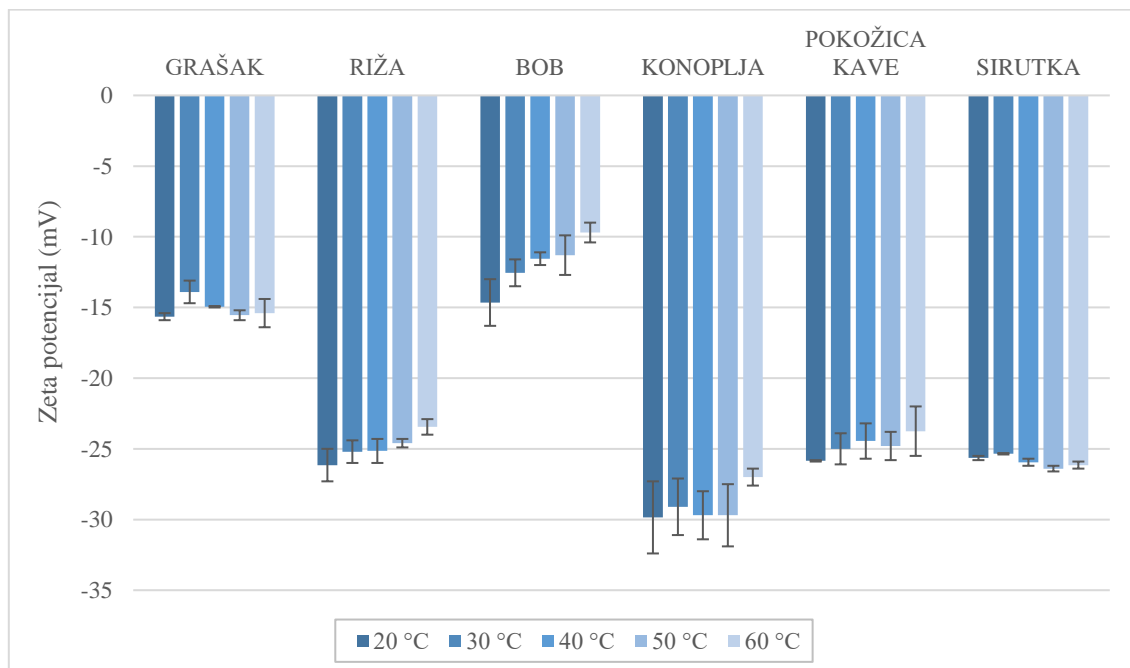
**Slika 24.** Prikaz 1%-tnih otopina proteina nakon što su stajali 24 h na 4°C (Vlastita fotografija)

#### 4.6. Spособnost vezanja vode i ulja

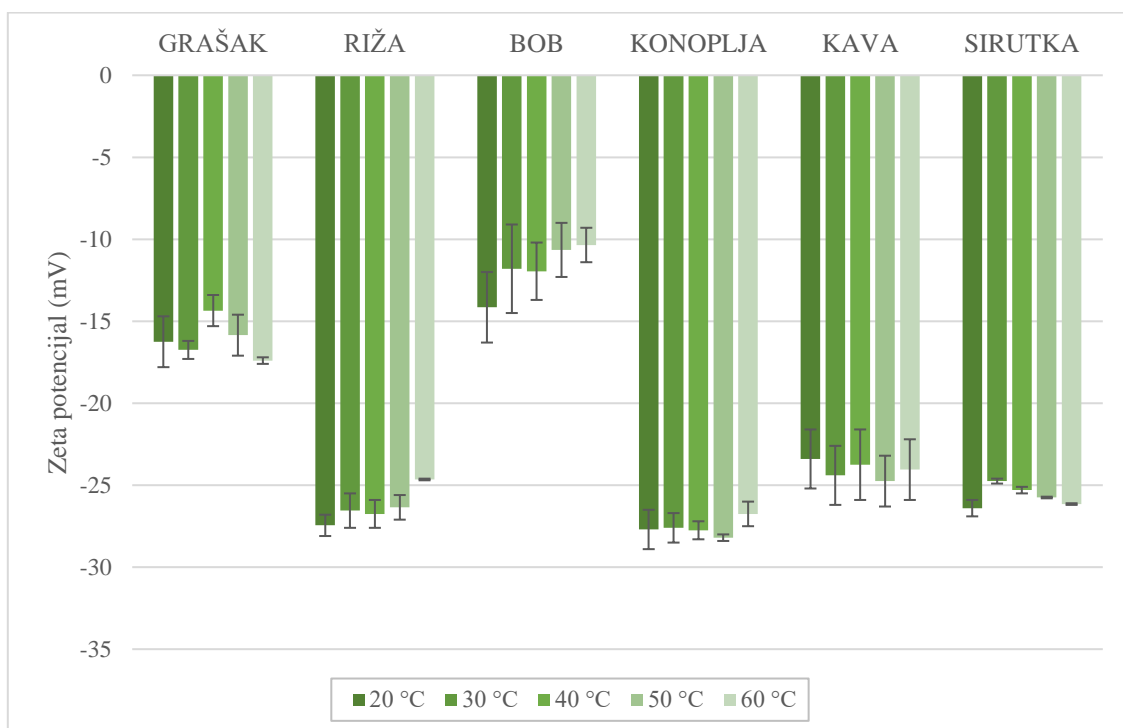


**Slika 25.** Rezultati sposobnosti vezanja vode (WHC) i sposobnosti vezanja ulja (OHC)

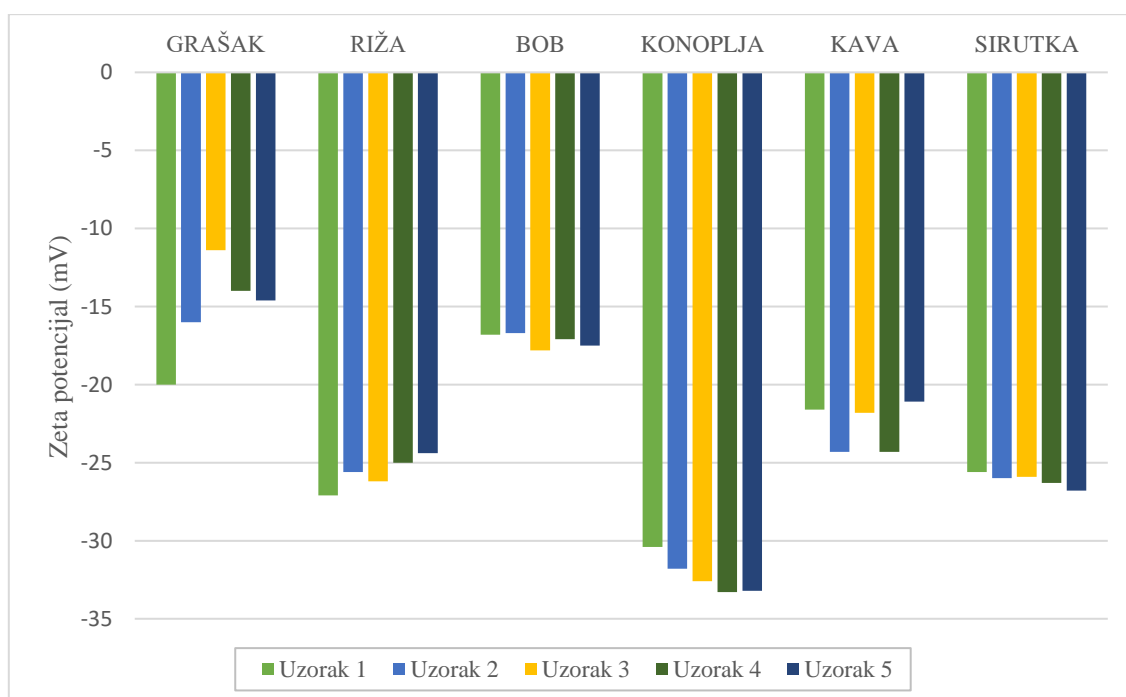
#### 4.7. Zeta potencijal



**Slika 26.** Zeta potencijal uzoraka u ovisnosti o temperaturi

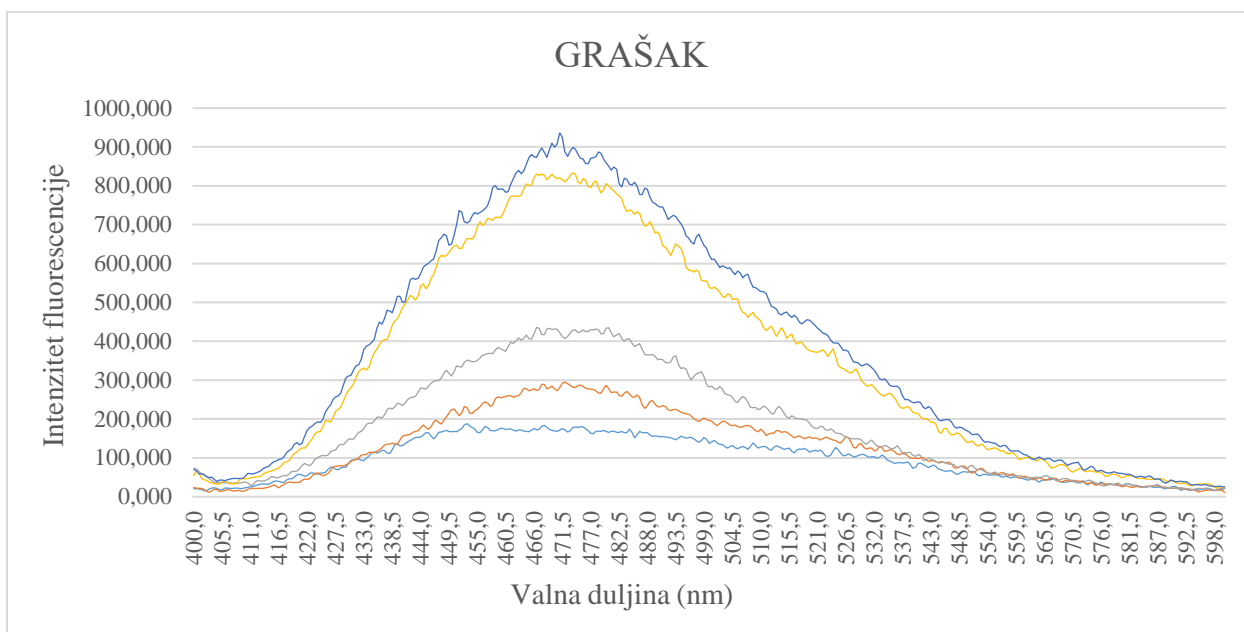


**Slika 27.** Zeta potencijal u ovisnosti o temperaturi nakon 24 h

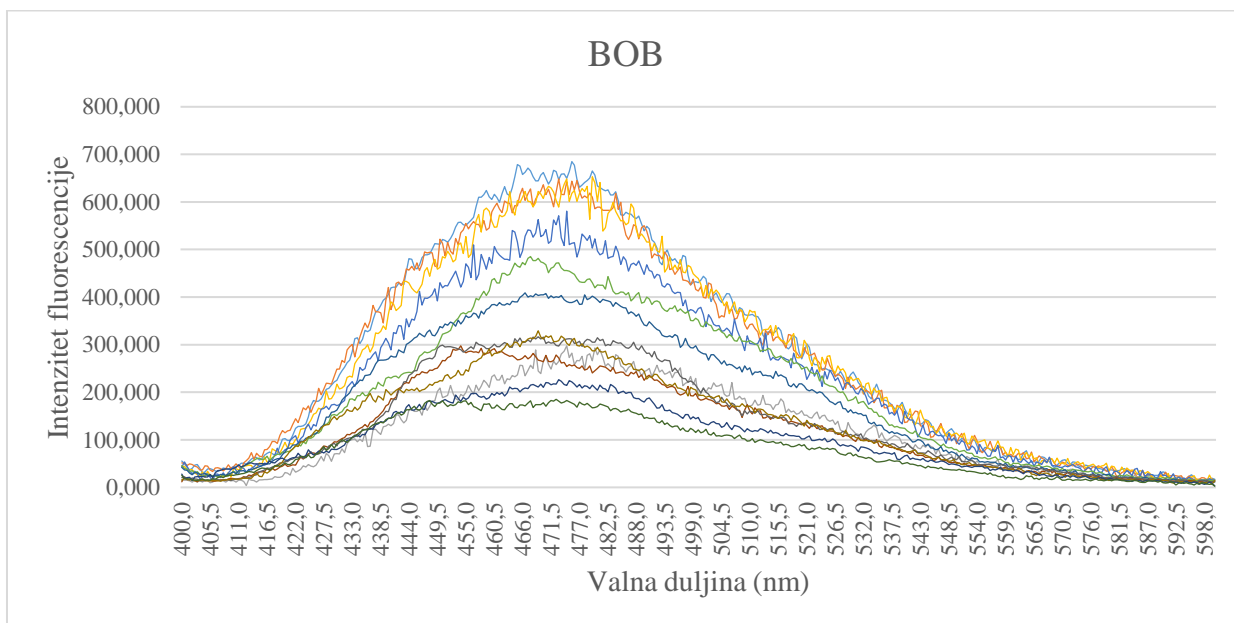


**Slika 28.** Zeta potencijal u pet uzastopnih paralela na sobnoj temperaturi (25°C)

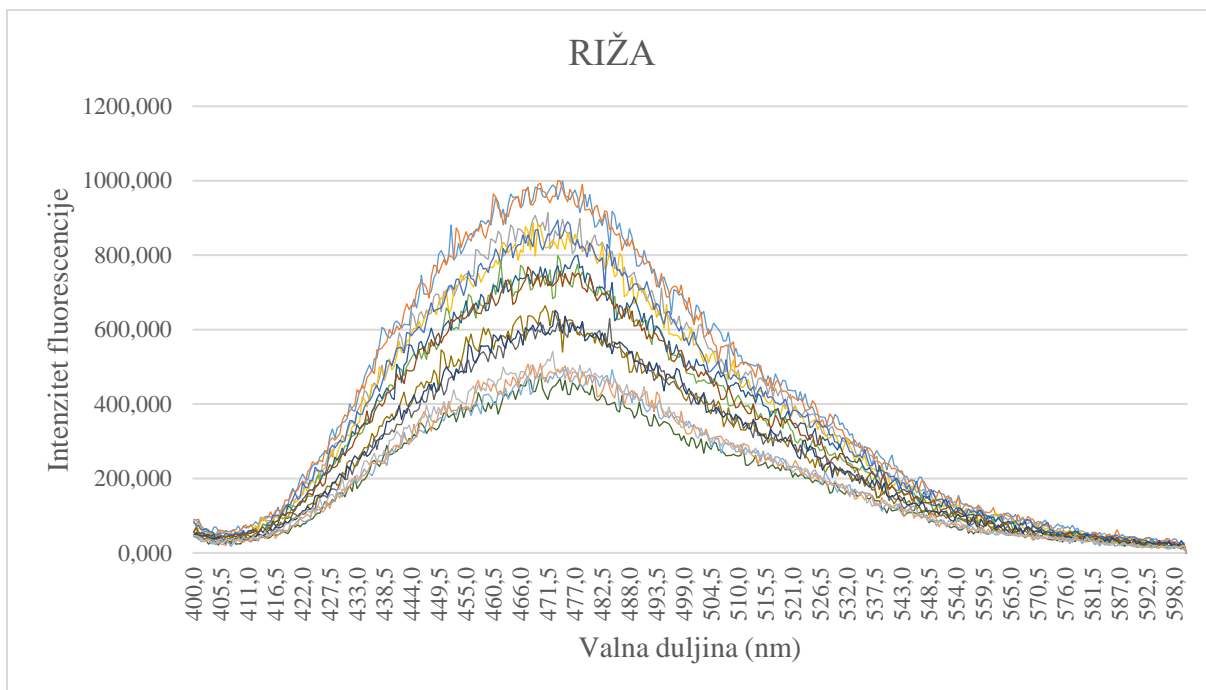
#### 4.8. Površinska hidrofobnost proteina



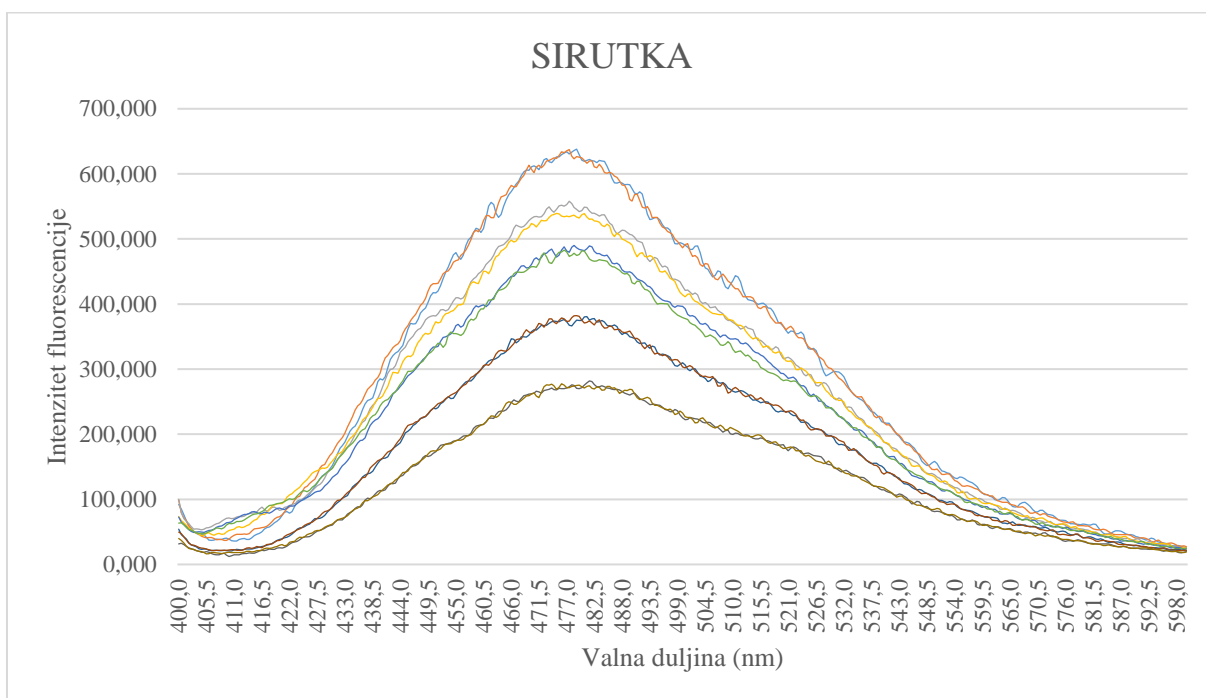
**Slika 29.** Graf ovisnosti intenziteta fluorescencije i valne duljine dobiven mjerenjem na fluorimetru ( $\lambda_{\text{pobude}} = 390 \text{ nm}$ , Slit Ex: 4.0, Slit Em: 4.0, Brzina mjerenja: 100 nm/min) za uzorak proteina graška



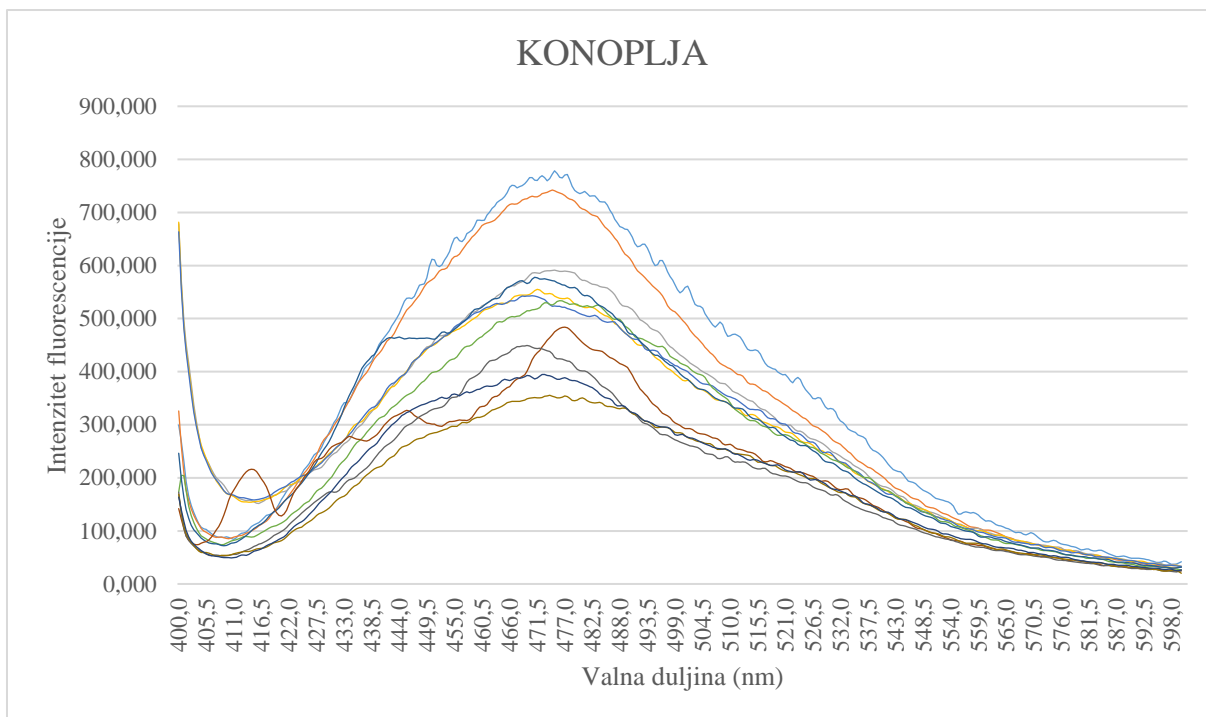
**Slika 30.** Graf ovisnosti intenziteta fluorescencije i valne duljine dobiven mjerenjem na fluorimetru ( $\lambda_{\text{pobude}} = 390 \text{ nm}$ , Slit Ex: 3.0, Slit Em: 3.0, Brzina mjerenja: 500 nm/min) za uzorak proteina boba



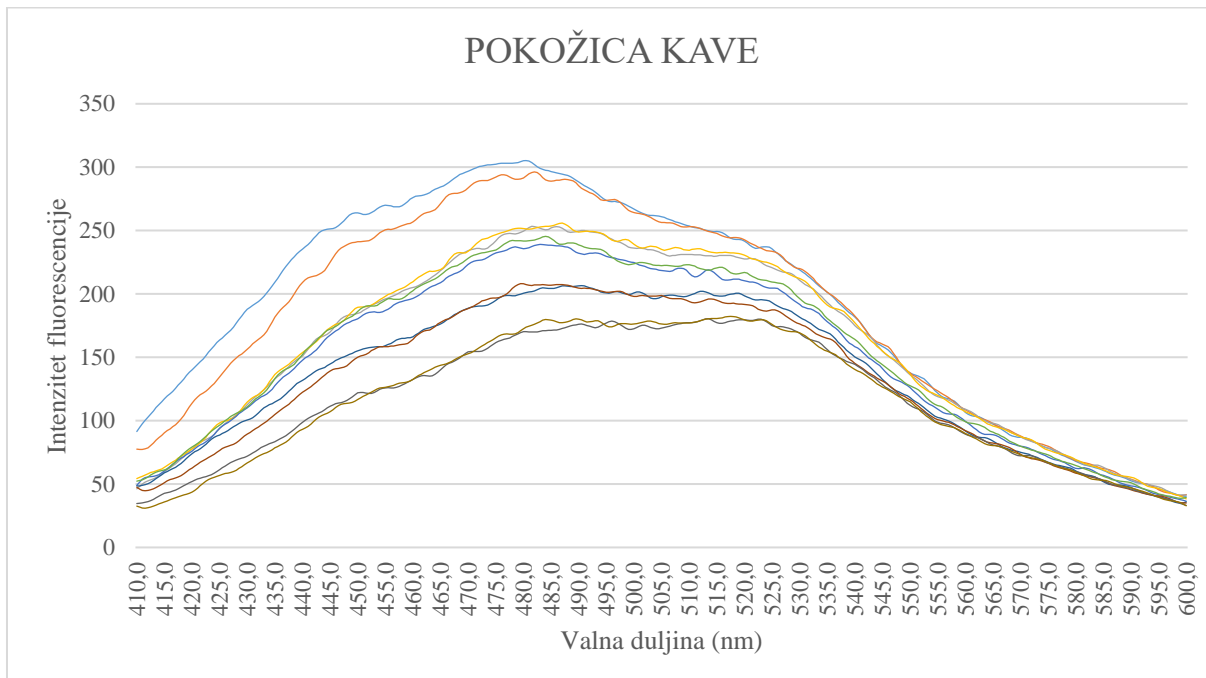
**Slika 31.** Graf ovisnosti intenziteta fluorescencije i valne duljine dobiven mjerenjem na fluorimetru ( $\lambda_{\text{pobude}} = 390 \text{ nm}$ , Slit Ex: 3,0, Slit Em: 3,0, Brzina mjerenja: 500 nm/min) za uzorak proteina riže



**Slika 32.** Graf ovisnosti intenziteta fluorescencije i valne duljine dobiven mjerenjem na fluorimetru ( $\lambda_{\text{pobude}} = 390 \text{ nm}$ , Slit Ex: 4,0, Slit Em: 4,0, Brzina mjerenja: 100 nm/min) za uzorak proteina sirutke

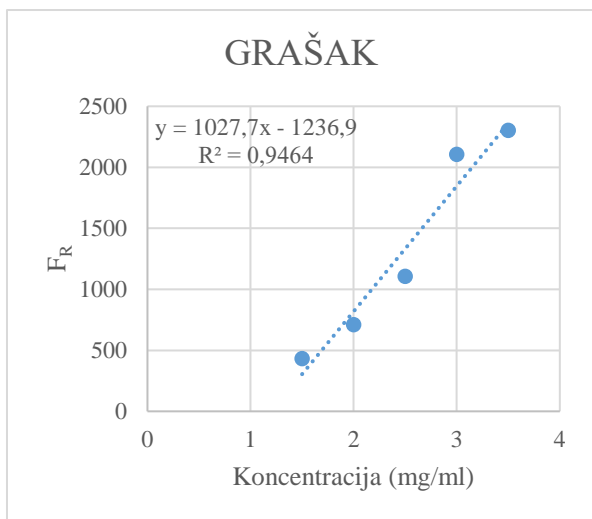


**Slika 33.** Graf ovisnosti intenziteta fluorescencije i valne duljine dobiven mjerenjem na fluorimetru ( $\lambda_{\text{pobude}} = 390 \text{ nm}$ , Slit Ex: 5.0, Slit Em: 5.0, Brzina mjerenja: 100 nm/min) za uzorak proteina konoplje

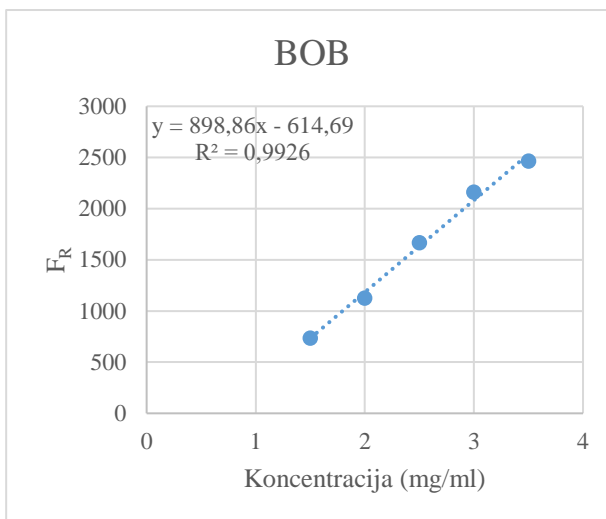


**Slika 34.** Graf ovisnosti intenziteta fluorescencije i valne duljine dobiven mjerenjem na fluorimetru ( $\lambda_{\text{pobude}} = 390 \text{ nm}$ , Slit Ex: 8.0, Slit Em: 8.0, Brzina mjerenja: 500 nm/min) za uzorak pokožice kave

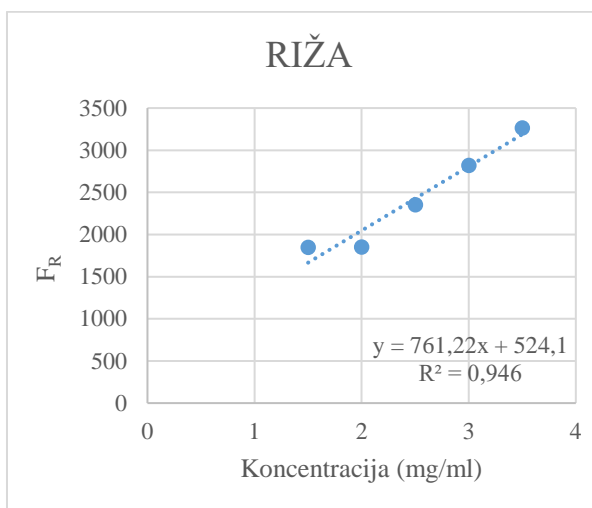




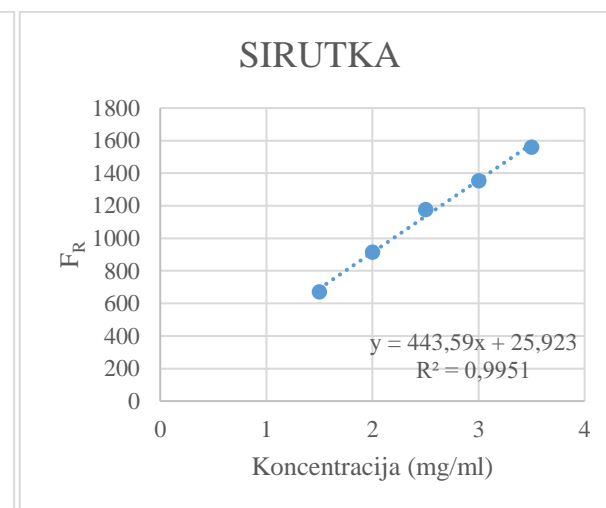
(A)



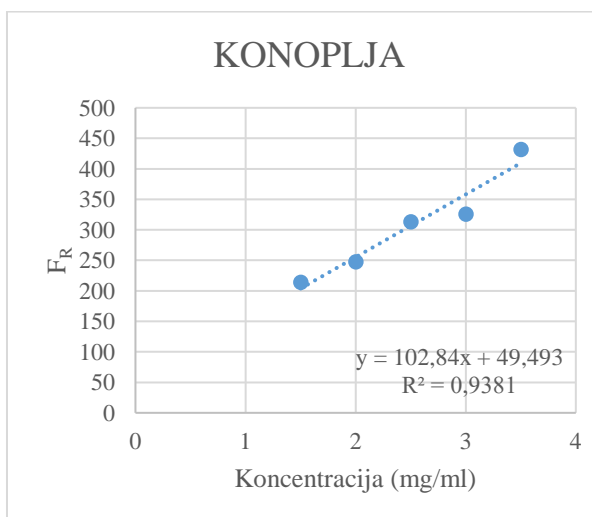
(B)



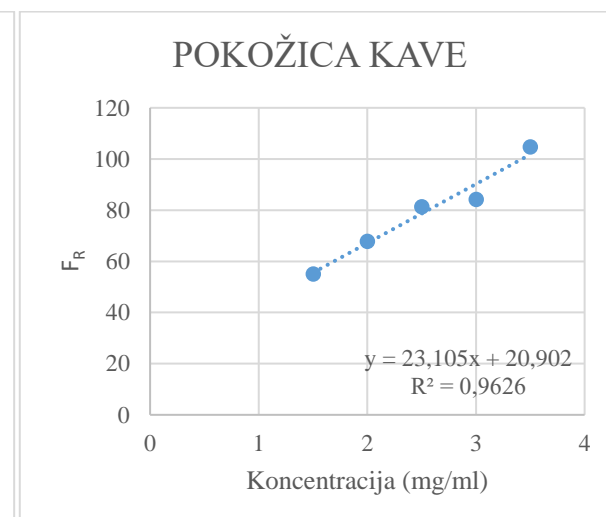
(C)



(D)



(E)



(F)

**Slika 35.** Grafovi ovisnosti  $F_R$  o koncentraciji uzorka za proteine a) graška, b) boba, c) riže, d) sirutke, e) konoplje i f) pokožice kave

**Tablica 5.** Prikaz rezultata površinske hidrofobnosti proteina u analiziranim uzorcima

<b>UZORAK</b>	<b>HIDROFOBOST</b>
<i>GRAŠAK</i>	1027,70
<i>BOB</i>	898,86
<i>RIŽA</i>	761,22
<i>SIRUTKA</i>	443,59
<i>KONOPLJA</i>	102,84
<i>KAVA</i>	23,11

## 4.9. Statistička analiza podataka

**Tablica 6.** Statistički značaj (p-vrijednost) rezultata analiza između ispitanih proteina

	<b>p-vrijednost</b>
<b>Količina proteina</b>	< 0,0001
<b>Veličina čestica (20°C)</b>	< 0,0001
<b>Veličina čestica (30°C)</b>	< 0,0001
<b>Molekularna masa</b>	< 0,0001
<b>Pjenjenje (5min)</b>	0,0022
<b>Pjenjenje (10min)</b>	0,0136
<b>Pjenjenje (15min)</b>	0,0041
<b>Pjenjenje (ISP)</b>	0,0001
<b>Pjenjenje (MSP)</b>	< 0,0001
<b>Emulgiranje (IAE)</b>	0,0071
<b>Emulgiranje (ISE)</b>	0,0027
<b>WHC</b>	< 0,0001
<b>OHC</b>	0,2421
<b>ZP 25°C</b>	< 0,0001
<b>ZP 0H 20°C</b>	0,0008
<b>ZP 0H 30°C</b>	0,0002
<b>ZP 0H 40°C</b>	0,0004
<b>ZP 0H 50°C</b>	0,0002
<b>ZP 0H 60°C</b>	< 0,0001
<b>ZP 24H 20°C</b>	0,0017
<b>ZP 24H 30°C</b>	0,0014
<b>ZP 24H 40°C</b>	0,0004
<b>ZP 24H 50°C</b>	0,0002
<b>ZP 24H 60°C</b>	< 0,0001

\*ZP 0H = zeta potencijal izmjeren nakon pripreme suspenzije

\*ZP 24H = zeta potencijal izmjeren nakon 24 sata

\*p-vrijednosti koje su manje od 0,05 ukazuju na statistički značajno različite rezultate

**Tablica 7.** Statistički značaj (p-vrijednost) rezultata biljnih proteina u usporedbi s proteinima sirutke

<i>UZORAK</i>	<i>p-vrijednost</i>
<i>GRAŠAK</i>	< 0,0001
<i>RIŽA</i>	< 0,0001
<i>BOB</i>	< 0,0001
<i>KONOPLJA</i>	0,002
<i>KAVA</i>	< 0,0001

Tablica 8. Vrijednosti korelacija provedenih analiza

	Količina proteina	Veličina čestica 20°C	Veličina čestica 30°C	Molekularna masa	Pjenjenje 5min	Pjenjenje 10min	Pjenjenje 15min	Pjenjenje ISP	Pjenjenje MSP	Emulgiranje IAE	Emulgiranje ISE	WHC	OHC	ZP 25°C	ZP 0H 20°C	ZP 0H 30°C	ZP 0H 40°C	ZP 0H 50°C	ZP 0H 60°C	ZP 24H 20°C	ZP 24H 30°C	ZP 24H 40°C	ZP 24H 50°C	ZP 24H 60°C
Količina proteina	1	0,105	-0,033	-0,180	0,693	0,578	0,598	0,435	-0,157	0,304	0,262	-0,078	-0,208	0,523	0,705	0,686	0,665	0,662	0,626	0,582	0,706	0,651	0,684	0,635
Veličina čestica 20°C		1	0,681	0,289	-0,032	0,012	-0,070	-0,691	0,278	-0,184	-0,734	0,196	0,243	0,535	0,546	0,572	0,641	0,680	0,726	0,575	0,589	0,557	0,625	0,723
Veličina čestica 30°C			1	0,317	-0,162	-0,090	-0,220	-0,705	0,248	-0,116	-0,632	0,813	-0,295	0,735	0,614	0,631	0,631	0,638	0,622	0,599	0,496	0,577	0,544	0,550
Molekularna masa				1	0,419	0,577	0,480	-0,217	0,995	0,437	-0,189	-0,060	-0,010	-0,148	-0,205	-0,195	-0,186	-0,144	-0,154	-0,369	-0,330	-0,333	-0,280	-0,216
Pjenjenje 5min					1	0,983	0,991	0,619	0,469	0,389	0,525	-0,384	0,065	0,141	0,205	0,180	0,171	0,184	0,118	-0,019	0,133	0,067	0,125	0,100
Pjenjenje 10min						1	0,989	0,524	0,621	0,435	0,448	-0,358	0,056	0,088	0,131	0,109	0,102	0,122	0,059	-0,104	0,038	-0,020	0,040	0,030
Pjenjenje 15min							1	0,631	0,535	0,386	0,549	-0,457	0,128	0,030	0,081	0,056	0,051	0,067	0,004	-0,143	0,010	-0,059	0,003	-0,013
Pjenjenje ISP								1	-0,153	0,056	0,969	-0,512	0,154	-0,208	-0,190	-0,230	-0,260	-0,286	-0,362	-0,299	-0,203	-0,247	-0,253	-0,340
Pjenjenje MSP									1	0,416	-0,132	-0,150	0,068	-0,183	-0,235	-0,227	-0,212	-0,169	-0,180	-0,401	-0,348	-0,363	-0,302	-0,234
Emulgiranje IAE										1	-0,086	-0,086	-0,653	-0,272	-0,050	-0,043	-0,101	-0,079	-0,056	-0,200	-0,117	-0,128	-0,094	-0,086
Emulgiranje ISE											1	-0,412	0,194	-0,206	-0,270	-0,312	-0,343	-0,375	-0,466	-0,368	-0,310	-0,330	-0,358	-0,456
WHC												1	-0,626	0,646	0,524	0,532	0,482	0,456	0,422	0,544	0,384	0,515	0,414	0,348
OHC													1	-0,190	-0,291	-0,295	-0,200	-0,183	-0,172	-0,222	-0,162	-0,252	-0,184	-0,111
ZP 25°C														1	0,941	0,937	0,932	0,917	0,867	0,914	0,872	0,914	0,880	0,829
ZP 0H 20°C															1	0,999	0,991	0,984	0,959	0,968	0,971	0,985	0,976	0,938
ZP 0H 30°C																1	0,994	0,988	0,969	0,972	0,973	0,987	0,980	0,948
ZP 0H 40°C																	1	0,998	0,985	0,975	0,982	0,986	0,989	0,970
ZP 0H 50°C																		1	0,991	0,964	0,978	0,977	0,988	0,978
ZP 0H 60°C																			1	0,959	0,977	0,967	0,988	0,994
ZP 24H 20°C																				1	0,979	0,995	0,981	0,953
ZP 24H 30°C																					1	0,989	0,998	0,981
ZP 24H 40°C																						1	0,990	0,960
ZP 24H 50°C																							1	0,987
ZP 24H 60°C																								1

\*crveno označene vrijednosti označavaju visoki stupanj korelacije

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Količina proteina

Količina proteina određena je metodom po Lowryju uz pomoć standardne otopine proteina BSA pomoću koje je izrađen baždarni pravac (Slika 19). Dobivena jednadžba pravca je  $y = 2,604x + 0,0355$ , gdje  $y$  označava apsorbanciju, a  $x$  označava koncentraciju. Dobiveni su rezultati prikazani u Tablici 2. Iz rezultata se može primijetiti da najveću koncentraciju proteina ima uzorak boba, što je i očekivano, s obzirom na to da je uzorak boba izolat proteina s koncentracijom većom od 85%. Nakon boba, prema koncentraciji slijede sirutka i grašak, što je također očekivano, s obzirom da su podjednako deklarirani. Znatno niže koncentracije imaju riža, koja je deklarirana približno kao i proizvod proteina graška i sirutke, te konoplja za koju je očekivano da ima niže rezultate jer prema deklaraciji ima znatno nižu količinu proteina na 100 g proizvoda u usporedbi s graškom i sirutkom. Najmanju količinu, očekivano, ima uzorak pokožice kave, koji prema literaturi ima i do 20% proteina (Wen i sur., 2020). O količini proteina ovise funkcionalna svojstva ispitana u ovome radu, a različite količine proteina u uzorcima također su razlog zašto se i ispitana svojstva mogu razlikovati od drugih istraživanja.

Martínez-Velasco i sur. (2018) utvrdili su da izolati proteina boba imaju znatno veće količine proteina (89,02 g/100g) u usporedbi s brašnom proteina boba (26,83 g/100g), što u teoriji jest tako s obzirom na način proizvodnje izolata. Izolat boba u ovom radu također sadrži više od 85% proteina. Gorissen i sur. (2018) su analizirali količinu proteina u raznim uzorcima biljnih izvora proteina među kojima su i grašak gdje je utvrđeno 80% proteina, konoplja s 51% proteina te tamna riža s 79% proteina. Jednaku količinu proteina imali su i uzorci korišteni u ovom radu, a razlike u količini proteina u uzorcima su moguće i kod različitih dobavljača s obzirom na drugačije metode izolacije proteina (Gorissen i sur., 2018). Uobičajena količina proteina u koncentratu proteina sirutke je 65-80% (Andrade i sur., 2018), a u pokožici kave je određeno do 20% proteina (Machado i sur., 2020), što se također slaže s količinom proteina u uzorcima korištenim u ovom radu.

### 5.2. Veličina čestica

Određivanje veličine čestica postala je jedna od važnih metoda analize u mnogim industrijama, jer utječe kako na proizvodni proces, tako i na konačna svojstva proizvoda. Veličina čestica može utjecati na gustoću, viskoznost i protok suspenzije, što ima utjecaj na pumpanje, miješanje i transport sirovina. Osim toga, skladištenje i stabilnost hrane također snažno ovise o veličini

čestica, to je primjer kod emulzija kod kojih se ne prati veličina čestica zbog čega se može narušiti njena stabilnost. Veličina čestica također snažno utječe na organoleptička svojstva prehrambenih proizvoda. Kako je ljudski jezik sposoban osjetiti čestice veličine samo nekoliko mikrona, podešavanjem veličine čestica može se znatno utjecati na percepciju proizvoda. Veličina čestica u hrani važna je i zbog reaktivnosti, topljivosti, teksture i osjećaja hrane u ustima (Mermelstein, 2016).

Slika 20 prikazuje veličinu čestica u otopinama proteina na temperaturama 20°C i 30°C. Može se primijetiti da su veličine čestica riže, boba i pokožice kave podjednake i kreću se oko 5000 nm, točnije riža (4793,67±468,6 nm; 5431±338,8 nm), bob (6657,71±1822,4 nm; 4820,29±1233,4 nm), kava (3873,38±1191,6 nm; 4786,13±1247,4 nm). Najmanju veličinu čestica ima sirutka čija je veličina čestica na 20°C 189,14±1,7 nm, odnosno 189,01±1,4 nm na 30°C. Konoplja u usporedbi s ostalim otopinama proteina, također, ima manju veličinu čestica i to 1702,13±172,6 nm na 20°C te 1639,60±123,2 nm na 30°C. Grašak ima velika odstupanja na temperaturama 20°C (6657,71±732,6 nm) i 30°C (7178,38±1120,6 nm) i može se primijetiti da mu je na višoj temperaturi veličina čestica veća. No, s obzirom da se otopina proteina graška u jako kratkom vremenu vrlo brzo taložila pretpostavka je da je sedimentacija čestica u kiveti za vrijeme mjerenja imala velik utjecaj na raznolikost rezultata. Osim toga, može se pretpostaviti da su na odstupanja u mjerenjima utjecaj imale i primjese, s obzirom na to da korišteni uzorci nisu 100% izolirani proteini, već se proteini u uzorcima nalaze u različitim koncentracijama (od 20% u uzorku pokožice kave, 50% u uzorku konopljinog proteinskog praha, pa do 80% u uzorcima proteina sirutke, graška i riže i više od 85% u uzorku boba).

Vrlo velike razlike u veličini čestica proteina sirutke i biljnih proteina može biti jedan od razloga sporije i lošije topljivosti biljnih proteina, s obzirom na to da je njihova ukupna površina manja u usporedbi s manjim česticama sirutke. Manje čestice ukupno daju veću površinu proteina gdje voda lakše dolazi u kontakt i stvara veću kontakt površinu između proteina i vode, zbog čega se proteini mogu lakše i brže otopiti. Naravno, to nije jedini uvjet, hidrofobna površina proteina jedan je od razloga slabe topljivosti u vodi. Osim na topljivost, veličina čestica biljnih proteina ima utjecaj na brzo taloženje proteina u otopinama, zbog čega su suspenzije proteina vrlo nestabilne. Isto tako, veličina čestica može utjecati i na stabilnost emulzije, jer manje čestice, u pravilu, stvaraju stabilnije emulzije (Iyer i sur., 2015).

Zhao i sur. (2020) su određivali veličinu raznih proteinskih proizvoda pa tako i koncentrata proteina riže i graška te su došli do rezultata od 48,07 µm za rižu te 69,77 µm za grašak. Amagliani i sur. (2016) su određivali veličinu čestica tri različita koncentrata riže i rezultati su

bili 72,0  $\mu\text{m}$ , 46,4  $\mu\text{m}$  i 57,9  $\mu\text{m}$ , te za izolat proteina sirutke 51,7  $\mu\text{m}$ . Vogelsang-O'Dwyer i sur. (2020) su utvrdili da je veličina čestica brašna proteina boba 25,4  $\mu\text{m}$ , a izolat proteina boba 22,9  $\mu\text{m}$ . Iz literature se može vidjeti da veličina uzorka uvelike ovisi o uzorku i o tome je li uzorak u obliku izolata ili koncentrata, a osim toga primjećuje se da jedan uzorak nema jednu fiksnu veličinu čestice već ima veći raspon veličina.

### 5.3. Molekularna masa

Tipična metoda za određivanje molekularne mase, posebno makromolekula poput polimera i proteina je statično rasipanje svjetlosti (SLS). To je optička tehnika kojom se mjeri prosječni vremenski intenzitet raspršene svjetlosti. Osim toga, SLS se također može koristiti za određivanje drugog virijalnog koeficijenta (*eng. second virial coefficient*), koji pokazuje interakciju između čestica i otapala. Pozitivan predznak ukazuje da su interakcije čestica - otapalo jače od interakcija čestica - čestica, i obrnuto (Petrillo i Wu, 2021).

Rezultati dobiveni analizom molekularne mase (Tablica 3.) pokazuju da je ukupna molekularna masa otopine proteina riže (13460 $\pm$ 3213,60 kDa) najveća i to za nekoliko desetaka do stotina puta veća od ostalih uzoraka. Nakon riže, s gotovo 10 puta manjom masom, slijedi otopina proteina graška (1433,33 $\pm$ 184,45 kDa). Molekularne mase proteina sirutke i konoplje su vrlo slične (332,33 $\pm$ 4,78 kDa i 321 $\pm$ 85,96 kDa) te zatim s duplo manjom molekularnom masom slijedi otopina proteina boba (176,33 $\pm$ 36,61 kDa) te otopina pokožice kave s najmanjom molekularnom masom od 64,93 $\pm$ 13,63 kDa.

Mohanta i sur. (2019) su utvrdili da je molekularna masa biljnih proteina u granicama od 0,54 do 2236,8 kDa. Svi biljni proteini osim riže, ulaze u spomenute granice. Ono što je moguć razlog velikog odstupanja rižinih proteina su primjese u uzorku koje mogu pridonijeti ukupnoj molekularnoj masi.

Što se tiče vrijednosti dobivenih za drugi virijalni koeficijent, može se primijetiti da su predznaci pozitivni za otopine riže, graška i sirutke. To znači da ti uzorci stvaraju jače veze s otopinom vode nego molekule u uzorku međusobno, što bi značilo da bi ta tri uzorka mogla biti stabilna u otopinama. S druge strane otopine uzorak konoplje, boba i pokožice kave pokazuju negativan predznak što u konačnici znači da oni stvaraju stabilnije i jače veze među molekulama unutar uzorka nego što su to veze čestica – otapalo, pa su zbog toga te otopine nestabilne.

#### 5.4. Svojstva pjenjenja

Formiranje pjene ovisi o sposobnosti proteinskih lanaca da se otvore i usmjere na međupovršinu tekućina - zrak. Za formiranje stabilne pjene neophodna je brza difuzija proteina na međupovršinu radi smanjenja površinske napetosti. Pri tome dolazi do djelomičnog otvaranja proteinske molekule što rezultira inkorporiranjem mjehurića zraka i asocijacijom proteinskih molekula, čime se stvara intramolekulski kohezivni film određenog stupnja elastičnosti (Amagliani i sur., 2017). Količina inkorporiranog zraka može se izraziti povećanjem volumena izraženog u postotcima. Povećanje volumena zabilježeno je svakih 5 minuta kroz 15 minuta miješanja 10%-tne otopine proteina, a rezultati su prikazani na Slici 21.

Na slici 21 može se vidjeti da sirutka, kao predstavnik životinjskih proteina u ovome radu, ima najveći postotak povećanja pjene (5 min: 556,585%, 10 min: 534,595%, 15 min: 645,38%), odnosno najveću sposobnost pjenjenja. Od biljnih proteina, rižini proteini su po postotku povećanja pjene najbolji u usporedbi s ostalim analiziranim biljnim proteinima (5 min: 459,525%, 10 min: 558,36%, 15 min: 560,085%). S obzirom da uzorak rižinih proteina sadrži manju količinu proteina ( $0,196 \pm 0,011$  mg/g) u usporedbi s graškom ( $0,384 \pm 0,055$  mg/g) i bobom ( $0,536 \pm 0,013$  mg/g), koji s većom koncentracijom nisu pokazali takve rezultate, dobiveni rezultati su vrlo dobri i riža pokazuje sličnu sposobnost pjenjenja kao i proteini sirutke. Proteini boba i graška su također pokazali sposobnost pjenjenja. Grašak je u usporedbi s bobom (5 min: 339,115%, 10 min: 311,27%, 15 min: 337,745%), rižom i sirutkom imao najmanju mogućnost pjenjenja (5 min: 222,89%, 10 min: 222,71%, 15 min: 191,45%). Proteini konoplje i nusproizvod kave nisu pokazali naznake pjenjenja te ni nakon više od 5 minuta miješanja nisu stvarali pjenu, stoga daljnja mjerenja vezana za pjenjenje na njima nisu provedena. S obzirom da se u uzorku nusproizvoda kave nalazi tek oko 20% proteina, a u konopljinom proteinskom prahu oko 50% proteina, vrlo je vjerojatno da otopine nisu pokazale sposobnost pjenjenja zbog malih koncentracija proteina.

Tablica 4. prikazuje rezultate indeksa stabilnosti pjenjenja izražene u sekundama u trenutku pada prve kapi tekućine iz pjene te rezultate maksimalne stabilnosti pjene izražene u minutama potrebnim da padne zadnja kap tekućine, odnosno vrijeme potrebno da se ocijedi sva pjena. Dobiveni rezultati proteina sirutke pokazuju da indeks stabilnosti pjene sirutkinih proteina iznosi 38 sekundi što je u usporedbi s ostalim pjenama najveći indeks stabilnosti, a maksimalna stabilnost pjene je gotovo 8 minuta. Proteini riže imaju najstabilniju pjenu, koja je i nakon više od jednog sata održala svoju strukturu i nije se u potpunosti narušila kao što je to slučaj kod ostalih uzoraka. Ipak, indeks stabilnosti pjene riže, kao i boba, iznosio je 0, iz razloga što se



tekućina krenula izdvajati i prije samog prenošenja pjene u lijevak, no bez obzira na brzo izdvajanje tekućine, preostala pjena je bila stabilna. Maksimalna stabilnost proteina graška bila je podjednaka stabilnosti pjene proteina sirutke, a pjena koju su uspjeli stvoriti proteini boba bila je stabilna nešto više od 4 minute.

Jethwa i sur. (2018) su u svom radu dokazali da kava pokazuje sposobnost pjenjenja i da ima dobru stabilnost pjene, no njihovi uzorci kave su imali veći postotak proteina što je moguć razlog razlikovanja od rezultata u ovom radu. Tömösközi i sur. (2001) su dokazali da grašak ima slabiju sposobnost pjenjenja od soje dok su Aluko i sur. (2009) u svom radu zaključili da proteini graška imaju dobru sposobnost pjenjenja. Moguć razlog razlikovanja njihovih rezultata jest korištenje različitih metoda izolacije proteina, različito tretirani proteini i moguća različita količina proteina. Mortuza i sur. (2009) su zaključili da bob ima dobar kapacitet pjenjenja i pjena mu je bila stabilna nekoliko sati, što je nešto drugačije nego u ovome radu gdje se stabilnost pjene proteina boba pokazala stabilnom kroz kratko vrijeme. Prema istraživanju Wang i sur. iz 2015. godine, sposobnost pjenjenja riže uspoređena je s pjenjenjem bjelanjaka. Aluko i sur. (2009) su utvrdili da proizvodi s većom koncentracijom proteina stvaraju stabilnije pjene, Malomo i sur. (2014) su to i dokazali na proteinima konoplje, što bi potvrdilo rezultate dobivene u ovom istraživanju, gdje je koncentracija proteina u samom proizvodu niska da bi se od 10%-tne otopine mogla proizvesti stabilna pjena. Nestaj i Sołowiej su 2020. godine ispitivali svojstva pjenjenja proteina sirutke na različitim pH vrijednostima i time dokazali da se promjenom pH, također znatno utječe na stabilnost i stvaranje pjene. Stabilnost pjene je bila zadovoljavajuća na pH 7, ali su najpoželjnija svojstva dobivena na višim pH vrijednostima. Literatura dokazuje da se mijenjanjem različitih parametara može znatno utjecati na stabilnost i sposobnost stvaranja pjene.

### 5.5. Svojstva emulgiranja

Indeks aktiviteta emulzije (IAE) odražava sposobnost proteina da se brzo adsorbira na granici voda/ulje tijekom stvaranja emulzije sprječavajući flokulaciju i povezivanje uljnih čestica, a indeks stabilnosti emulzije (ISE) odražava sposobnost proteina da tijekom određenog razdoblja održava stabilnu emulziju sprečavanjem flokulacije i povezivanja uljnih kuglica (Lam i Nickerson, 2014).

Prema rezultatima prikazanim na Slici 22 može se primijetiti da proteini riže i konoplje imaju veću sposobnost adsorbiranja na granici voda/ulje jer su njihovi indeksi aktiviteta emulzije veći (riža:  $1760,4 \pm 12,4 \text{ m}^2/\text{g}$ , konoplja:  $1746,7 \pm 1,4 \text{ m}^2/\text{g}$ ) u usporedbi s ostalim uzorcima. IAE boba

( $1398,8 \pm 226,4 \text{ m}^2/\text{g}$ ), sirutke ( $1498,9 \pm 1,5 \text{ m}^2/\text{g}$ ) i graška ( $1596,7 \pm 32,8 \text{ m}^2/\text{g}$ ) ima približne vrijednosti, dok nusproizvod kave, odnosno pokožica kave pokazuje najmanju mogućnost emulgiranja ( $774,5 \pm 165,8 \text{ m}^2/\text{g}$ ). Niže vrijednosti kod uzorka pokožice kave su očekivane s obzirom da se u samom uzorku nalazi oko 20% proteina. Ukoliko usporedimo rezultate indeksa aktiviteta i indeksa stabilnosti emulzije, bez obzira na vrlo dobre rezultate indeksa aktiviteta emulzije, indeksi stabilnosti su dosta niski. Rezultati indeksa aktiviteta emulzije pokazali su podjednake vrijednosti među uzorcima jer su emulzije odmah nakon miješanja mjerene na UV/VIS spektrofotometru te je njihova početna stabilnost bila zadovoljavajuća, no nakon nekoliko minuta moglo se primijetiti odvajanje slojeva i taloženje proteina.

Rezultati indeksa stabilnosti emulzije (Slika 23) određeni su nakon što su otopine proteina stajale 24 h na  $4^\circ\text{C}$ . Iz ovih rezultata i usporedbom proteina sirutke s biljnim proteinima, može se vidjeti velika razlika u sposobnosti održavanja stabilne emulzije. Nakon 24 h najstabilniju emulziju održali su proteini sirutke, dok su vrijednosti za ISE biljnih proteina čak u pola manje, odnosno stabilnost emulzije kod biljnih proteina s vremenom značajno opada. Jedan od razloga vrlo dobrih emulgirajućih svojstava sirutke je i taj što koncentrat proteina sirutke korištenom u ovom radu sadrži emulgator, suncokretov lecitin, koji je imao utjecaj na sposobnost emulgiranja proteina sirutke.

O samoj stabilnosti emulzije moglo se zaključiti i vizualnim zapažanjem. Na Slici 24 može se vidjeti kako izgledaju 1%-tne otopine proteina nakon 24 sata. Može se primijetiti da je nakon 24 h jedina stabilna emulzija otopina proteina sirutke. To je jedina otopina gdje su čestice ostale jednako raspršene u cijelom vodenom mediju, dok su sve ostale otopine istaložene i gornji sloj je gotovo bistar.

Bolja emulgirajuća svojstva proteina sirutke mogu se povezati s njihovom manjom molekularnom masom, odnosno manjom veličinom molekule proteina u odnosu na molekule biljnih proteina (Tablica 3. i 4.). Proteinski lanci manje molekularne mase brže dopijevaju na međufaznu površinu, puno su fleksibilniji i imaju bolju sposobnost reorijentacije na granici faza pa su prema tome i bolji emulgatori. Osim toga, Iyer i sur. (2015) su u svom radu dokazali da su emulzije s malom veličinom čestica stabilnije i otpornije na temperaturne utjecaje, nego li emulzije s većim česticama.

Jethwa i sur. (2018) su u svom radu, usporedbom proteina pokožice kave i proteina soje dokazali da kava ima bolju sposobnost emulgiranja od soje. Mogući razlog zašto je njihov uzorak pokazao dobra svojstva emulgiranja je taj što su koristili uzorak s većom koncentracijom

proteina. Tömösközi i sur. (2001) u svom radu su dokazali da proteini graška imaju dobru aktivnost emulgiranja, ali lošu stabilnost emulzije što se slaže s rezultatima dobivenim u ovom radu. Wang i sur. su 2015. u svom radu tvrdili da je sposobnost emulgiranja riže dosta niska, a 2020. su to potvrdili i Zhao i suradnici, rezultati ovog rada slažu se s rezultatima prethodnih radova. Yin i sur. (2007) su utvrdili da proteini konoplje nemaju dobra emulgirajuća svojstva te da su ta svojstva lošija u usporedbi sa sojinim proteinima, a loša sposobnost emulgiranja potvrđena je i ovim radom. Malomo i Aluko su 2015. godine utvrdili da koncentracije proteina općenito imaju lošiju sposobnost emulgiranja jer, u pravilu, imaju veće čestice, dok izolati koji imaju sitnije čestice stvaraju bolje emulzije, njihovi rezultati pokazuju da tehnika korištena za pripremu proizvoda utječe na emulgirajuća svojstva. Karaca i sur. (2011) su uspoređivali emulgirajuća svojstva boba, graška i drugih mahunarki, prema njihovim rezultatima bob je pokazao bolja emulgirajuća svojstva u usporedbi s graškom, što u ovom radu nije slučaj. Uzorci graška su bili i hidrofobniji i pokazali nešto bolja svojstva emulgiranja od boba, a razlog tome može biti tretiranje i utjecaj izoliranja proteina, što utječe na njegova svojstva, njegovu građu, a posljedično i na funkcionalna svojstva. Shen i sur. su 2016. dokazali da se emulgirajuća svojstva sirutke mogu znatno poboljšati tretiranjem uzoraka ultrazvukom. Pretpostavka je da dolazi do smanjenja veličine čestica i viskoznosti te do povećanja hidrofobnosti što pozitivno utječe na emulgirajuća svojstva.

#### 5.6. Sposobnost vezanja vode i ulja

WHC je sposobnost proteina da spriječe otpuštanje vode iz svoje trodimenzionalne strukture. WHC ima veliku važnost u održavanju teksture hrane, naročito u usitnjenim mesnim proizvodima i pekarskim proizvodima. S druge strane OHC je važan kod organoleptičkih svojstava, odnosno osjećaja hrane u ustima i poboljšavanju okusa. Prisutnost lipida, fizikalno-kemijska okoline (pH, ionska snaga) i topljivost proteina neki su od čimbenika koji bi mogli pridonijeti WHC i OHC bilo koje molekule proteina u prehrambenom sustavu, a osim toga WHC i OHC mogu biti dobri pokazatelji hidrofiličnih/hidrofobnih grupa na proteinu (Malomo i Aluko, 2015).

Slika 25 prikazuje rezultate sposobnosti vezanja vode i ulja svakog pojedinačnog uzorka. Ono što se prvo primjećuje jest izrazito velika sposobnost vezanja vode kod proteina graška ( $8,275 \pm 0,005$  g/g), u usporedbi s ostalim proteinima. Osim iz rezultata, higroskopnost uzorka proteina graška mogla se primijetiti i vizualno s obzirom da sam uzorak graška nije bio praškast već je bio zgrudan s obzirom da je lako upijao vodu (Slika 15-A). Rezultati WHC proteina sirutke pokazali su se najnižima ( $0,4 \pm 0,4$  g/g), s obzirom da se proteini sirutke u potpunosti

otope u vodi, stoga se prilikom centrifuge odvoji jako malo taloga od supernatanta pa rezultati pokazuju jako malu sposobnost vezanja vode. Proteini riže, boba i konoplje imaju podjednaku sposobnost vezanja vode ( $2,635 \pm 0,005$  g/g,  $2,475 \pm 0,195$  g/g i  $2,31 \pm 0,190$  g/g), dok uzorak pokožice kave ima nešto više vrijednosti od njih ( $4,105 \pm 0,085$  g/g). Ukoliko usporedimo vrijednosti kapaciteta vezanja ulja, oni su podjednaki između svih uzoraka pa tako i usporedbom biljnih proteina s proteinima sirutke. Proteini sirutke, zbog prethodnog objašnjenja, pokazuju veću sposobnost vezanja ulja ( $2,555 \pm 0,515$  g/g), dok je kod graška obrnuto ( $1,6 \pm 0,330$  g/g), on može vezati puno manje ulja u usporedbi s vodom. Svi ostali proteini pokazuju podjednaku mogućnost vezanja i vode i ulja.

Jethwa i sur. (2018) u svom radu su dokazali da je sposobnost pokožice kave prema vezanja ulja veća, nego za vezanje vode, što je u ovom radu suprotno, no većinu uzorka korištenog u ovom radu čine primjese koje mogu imati utjecaj na vezanje vode i ulja. Tömösközi i sur. (2001) su dokazali da grašak ima nisku sposobnost vezanja vode i ulja, a Zhao i sur. su 2020. u svom radu utvrdili sposobnost graška za vezanja vode od  $3,389$  g/g, a sposobnost vezanja ulja od  $1,2$  g/g. Uzorak u ovom radu također je pokazao lošije vezanje ulja nego vode, ali sposobnost vezanja vode pokazala se puno veća nego što je to u literaturi. Tang i sur. (2006) su utvrdili da proteini konoplje nešto malo bolje vežu ulje nego vodu, a u radu Malumo i Aluko iz 2015. ta dva svojstva su se pokazala podjednaka, što se slaže s rezultatima dobivenim u ovom radu. Keivaninahr i sur. (2021) su dokazali da je WHC kod graška nešto veća od boba, dok bob veže nešto više ulja nego grašak, što se slaže s rezultatima dobivenim u ovom radu. Wang i sur. (2015) zaključili su da je WHC proteina ekstrahiranih iz rižinih mekinja veći od proteina ekstrahiranih iz smeđe i bijele riže, što su potvrdili Zhao i sur. (2020) kad su dokazali da izolati proteina na bazi rižinih endosperma i rižinih ostataka imaju  $2,81$ , odnosno  $3,02$  g/g, a rezultati ovoga rada pokazali su jednake vrijednosti. Što se tiče rezultata za OHC proteinski izolati dobiveni iz rižinog endosperma i rižinih ostataka imali su OHC od  $2,14$ , odnosno  $2,38$  g/g, što je nešto niže u usporedbi s WHC, što se također slaže s rezultatima ovog rada. Razlike u funkcionalnim svojstvima u raznoj literaturi mogu proizaći iz razlika u uvjetima ekstrakcije, razlika u korištenim metodama analiza pa i varijacijama u sastavu proteinskog materijala zbog razlika u sortama, uvjetima rasta i klimi.

### 5.7. Zeta potencijal

Zeta potencijal je ključni pokazatelj stabilnosti koloidnih disperzija. Općenito, veći zeta potencijal znači da će se čestice snažnije odbiti i tako dati stabilniju suspenziju.

Na slici 26 prikazani su rezultati zeta potencijala svih uzoraka u rasponu temperatura od 20°C do 60°C. Slika 27 prikazuje iste te uzorka nakon 24 h na istom rasponu temperatura od 20°C do 60°C. Dok Slika 28 prikazuje vrijednosti zeta potencijala uzoraka na sobnoj temperaturi. Mjerenja su provedena nakon 24 h kako bi se utvrdilo mijenja li se zeta potencijal, odnosno stabilnost suspenzije nakon nekog određenog vremena, a mjerenja na sobnoj temperaturi provedena su kako bi se utvrdilo ima li temperatura do 60°C utjecaj na proteine, a posljedično i na stabilnost suspenzije, odnosno zeta potencijal.

Sve vrijednosti zeta potencijala su iznad -30 mV što u teoriji znači da su otopine nestabilne, odnosno da su sklone aglomeraciji i taloženju, a to potvrđuju i rezultati emulgiranja. Vrijednosti koje su najbliže pa i nešto niže od -30 mV pokazala je otopina konopljinih proteina, no odmah ju slijede otopine proteina sirutke, proteina riže te pokožice kave čije se vrijednosti na svim temperaturama kreću oko -25 mV, zatim slijedi bob, čije se vrijednosti zeta potencijala kreću oko -17 mV i na kraju grašak čije su vrijednosti zeta potencijala na sobnoj temperaturi oko -15 mV.

Ukoliko usporedimo mjerenja prvi dan te nakon 24 h može se primijetiti da su rezultati podjednaki te da nema značajnih odstupanja, stoga se može zaključiti da je stabilnost suspenzija jednaka nakon 24 sata. Što se tiče utjecaja temperature, ukoliko se usporede rezultati na slikama 26 i 27, može se primijetiti da proteini graška nemaju određen trend prilikom povećanja temperature, a vrijednosti i na sobnoj temperaturi prosječno iznose -15 mV što nam govori da temperatura nema utjecaja na stabilnost suspenzije proteina graška, što je i očekivano, s obzirom da su proteini graška vrlo postojani na visokim temperaturama, a temperature denaturacije proteina graška kreću se oko 80-90°C (Owusu-Ansah i Mc Curdy, 1991). Što se tiče proteina riže, primjećuje se blagi porast zeta potencijala povećanjem temperature, no mjerenjem pri sobnoj temperaturi primijećen je jednako blag porast što dovodi do zaključka da temperatura nema utjecaja na stabilnost suspenzije proteina riže. Ovi rezultati su očekivani s obzirom da su proteini riže stabilni na višim temperaturama, a temperatura denaturacije proteina riže kreće se oko 70-80°C (Amagliani i sur., 2017). Utjecaj temperature na povećanje zeta potencijala može se primijetiti kod proteina boba gdje se zeta potencijal s oko -15 mV na 20°C podiže na -10 mV na 60°C. Te promjene nisu značajne, ali dokazuju blagi utjecaj temperature na proteine i posljedično na promjenu stabilnosti suspenzije proteina boba. Suspenzije proteina konoplje, pokožice kave i sirutke pokazuju jednake vrijednosti na sva tri grafa, što također dovodi do zaključka da temperatura u rasponu od 20°C do 60°C nema utjecaja na navedene uzorke. Suspenzija proteina konoplje jedina je suspenzija čije su se vrijednosti zeta potencijala

znatno približile vrijednostima od -30 mV što bi ju moglo svrstati u stabilnije suspenzije u usporedbi s ostalim, odmah nakon konoplje, slijede suspenzije proteina sirutke, riže i uzorak pokožice kave s vrijednostima zeta potencijala oko -25 mV, a prema rezultatima proteini boba i graška pokazali su se najnestabilniji u suspenzijama.

Usporede li se analizirani biljni proteini s proteinima sirutke može se vidjeti da je stabilnost suspenzije proteina sirutke podjednaka suspenzijama pokožice kave, konoplje i riže i mogu se smatrati stabilnijima u usporedbi s suspenzijama proteina boba i graška.

Karaca i sur. su 2011. godine utvrdili da je zeta potencijal proteina graška i boba podjednake veličine i kreće se oko -21 mV do -30 mV, a Keivaninahr i sur. su 2021. godine dokazali da je zeta potencijal graška i boba jednak bilo da se radi o koncentratima ili izolatima. Zeta potencijal dobiven za suspenziju proteina sirutke slaže se s rezultatom koje su dobili Sun i sur. (2018), a koji iznosi  $-23,91 \pm 2.08$  mV. Teh i sur. (2016) su mjerili zeta potencijal konopljinih proteina i isti je iznosio -9,2 mV, što je puno niže od rezultata dobivenih u ovom radu, mogući razlog tome su primjese u uzorku 50%-tnog konopljinog praha koji imaju utjecaj na zeta potencijal. Mandial i sur. (2018) ispitivali su ponašanje proteina riže na raznim pH vrijednostima te ustanovili da na  $\text{pH} \geq 7$  zeta potencijal iznosi -21 mV te se snižava do -25 mV, dok na nižim pH vrijednostima značajno pada.

#### 5.8. Površinska hidrofobnost proteina

Mjerenje površinske hidrofobnosti još je uvijek kontroverzno, jer niti jedna standardna metoda nikada nije usvojena kao službena metoda ispitivanja. Osim toga, hidrofobnost nije jednoliko raspoređena na površini proteina, a često ovisi o ionskoj snazi, pH i drugim svojstvima otapala (Deshpande i Sathe, 2018). U svrhu ovog rada koristila se metoda s fluorescentnim spojem ANS-om koji se veže za hidrofobne ostatke na površini proteina te daje određeni fluorescentni intenzitet u ovisnosti o količini hidrofobnih ostataka na površini proteina. Površinska hidrofobnost proteina uvelike ovisi o aminokiselinama koje se nalaze na površini proteina, odnosno o bočnim ograncima tih aminokiselina. Aminokiseline s hidrofobnim bočnim skupinama su: glicin, alanin, valin, leucin, izoleucin, metionin, prolin te fenilalanin i triptofan (Berg i sur., 2019).

Na slikama 29 - 34 mogu se vidjeti grafovi ovisnosti intenziteta fluorescencije u ovisnosti o valnoj duljini. Valna duljina mjerena je u granicama od 400,0 do 600,0 nm jer je valna duljina emisije fiksna valna duljina veličine 470 nm. Iz intenziteta fluorescencije očitanih na 470 nm za svaku analiziranu koncentraciju izrađeni su pravci linearne regresije i jednadžbe pravca, a

kao rezultat površinske hidrofobnosti uzet je koeficijent smjera pravca. Dobiveni pravci i jednadžbe pravca mogu se vidjeti na slikama 35(A-F), a grafovi iz kojih su dobiveni pravci i jednadžbe pravca, konstruirani su iz rezultata dobivenih analizom paralela te su konačni rezultati površinske hidrofobnosti prikazani u Tablici 5.

Iz dobivenih rezultata može se primijetiti da proteini graška imaju najviše hidrofobnih aminokiselinskih ostataka na površini proteinske globule, s obzirom na to da se najviše ANS-a vezalo i reagiralo s njima, a rezultat hidrofobnosti iznosi 1027,7. Nakon graška, prema hidrofobnosti slijedi bob čija je hidrofobnost iznosi 898,86 te riža sa 761,22. Nešto nižu hidrofobnost (443,59) imaju proteini sirutke, a u usporedbi sa svima najniže vrijednosti imaju konoplja (102,84) i pokožica kave (23,105). S obzirom na to da je primijećeno da su uzorci jako slabo topljivi u vodi, rezultati hidrofobnosti su dobiveni prema očekivanom redosljedu. Razlog niže hidrofobnosti konoplje i pokožice kave može biti niža koncentracije proteina u samim uzorcima, ali isto tako, moguće da su ostale primjese u uzorcima utjecale na rezultate. Visoki rezultati hidrofobnosti mogu biti i posljedica denaturiranja proteina prilikom njihovog izoliranja. Pojačana hidrofobnost rezultirala bi boljom interakcijom proteina s manje polarnim otapalom od vode, stoga se takvi proteini mogu koristiti u preljevima za kolače, preljevima za salate i drugim formulacijama na bazi ulja (Khan i sur., 2011.) Rezultati hidrofobnosti proteina ne slažu se u potpunosti s rezultatima emulgirajućih svojstava i veličinom čestica dobivenim u ovom radu, a moguć razlog tome je loša topljivost biljnih proteina koja može utjecati na rezultate (Paraman i sur., 2007).

U svom radu 2011. godine, Karaca i sur. su dokazali da je grašak hidrofobniji od boba, što je potvrđeno i rezultatima ovog rada, a 2020. godine Vogelsang-O'Dwyer i sur. (2020) su dokazali da izolat boba ima veću hidrofobnost od proteinskog brašna boba zbog samog procesa izolacije i sušenja proteina boba, što značajno utječe na njegovu građu i svojstva. Yin i sur. su 2007. ispitivali svojstva konopljinih proteina i došli do zaključka da su konopljini proteini slabo topljivi u vodi te su hidrofobni. Slaba topljivost primijetila se i s proteinima konoplje korištenim u ovom radu, konoplja je također pokazala hidrofobna svojstva, ali puno manja u usporedbi s ostalim analiziranim uzorcima. Paraman i sur. su 2007. ispitivali svojstva rižinih proteina te utvrdili da su rižini proteini hidrofobni i netopljivi u vodi što potvrđuju rezultati dobiveni u ovom radu. Moro i sur. (2001) su ispitivanjem hidrofobnosti zaključili da sirutka ima nisku površinsku hidrofobnost, što se također slaže s rezultatima ovog rada.

## 5.9. Statistička analiza podataka

Statističkom obradom podataka (ANOVA) dobiveni su rezultati p-vrijednosti (Tablica 6.) koji pokazuju odnos između svih analiziranih proteina. Statističkom analizom kovarijance (ANCOVA test) dobiveni su rezultati p-vrijednosti (Tablica 7.) koji prikazuju statistički značaj rezultata biljnih proteina u odnosu na sirutku kao referentni uzorak te vrijednosti koeficijenta korelacije  $r$  (Tablica 8.) između rezultata svih provedenih analiza.

Iz rezultata dobivenih u Tablici 6. može se primijetiti da samo rezultat sposobnosti vezanja ulja pokazuje p-vrijednost veću od 0,05 što znači da nema statistički značajne razlike među rezultatima sposobnosti vezanja ulja kod analiziranih proteina. Preostali rezultati p-vrijednosti su manji od 0,05, zbog čega se može zaključiti da se rezultati proteina statistički značajno razlikuju. Sukladno tome, biljni proteini se ne mogu smatrati jednakima. Zbog toga je potrebno analizirati funkcionalna svojstva svakog pojedinačnog proteina kako bi se na temelju analiza utvrdilo u koju svrhu bi bilo najbolje iskoristiti pojedini biljni protein. U Tablici 7. prikazane su p-vrijednosti biljnih proteina u odnosu na proteine sirutke. Može se primijetiti da su sve p-vrijednosti manje od 0,05, što znači da se svi rezultati provedenih analiza na biljnim proteinima statistički značajno razlikuju u odnosu na rezultate proteina sirutka.

Veliki koeficijenti korelacije pokazuju rezultati pjenjenja nakon 5 minuta i rezultati pjenjenja nakon 10 ( $r=0,983$ ) i 15 minuta ( $r=0,991$ ) te rezultati pjenjenja nakon 10 i nakon 15 minuta ( $r=0,989$ ). Visoki koeficijent korelacije ukazuje na to da varijable u velikoj mjeri ovise jedna o drugoj, a njihov pozitivan predznak označava proporcionalnost među rezultatima, što bi značilo da povećanje jedne varijable uzrokuje povećanje druge varijable. Iz Tablice 8. se također može vidjeti da rezultati MSP pokazuju veliku korelaciju s rezultatima molekularne mase ( $r=0,995$ ), što bi značilo da se povećanjem molekularne mase povećava i maksimalna sposobnost pjenjenja. Isto tako, rezultati ISE pokazuju veliku korelaciju s rezultatima ISP ( $r=0,969$ ), čime se utvrđuje da su stabilnost emulzije i stabilnost pjenjenja varijable ovisne jedna o drugoj. I na koncu, svi rezultati vezani za zeta potencijal pokazuju visoku korelaciju, što potvrđuje da se, neovisno o temperaturi i vremenu, rezultati zeta potencijala ponašaju jednako i međusobno su ovisni.



## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Uzorak proteina boba sadrži najveću količinu proteina ( $0,536 \pm 0,013$  mg/g), a uzorak pokožice kave najnižu količinu proteina ( $0,010 \pm 0,003$  mg/g).
2. Uzorak proteina sirutke ima najmanju veličinu čestica (na  $20^\circ\text{C}$  189,14 nm; na  $30^\circ\text{C}$  189,01 nm) to utječe na bolju topljivosti proteina sirutke u usporedbi s biljnim proteinima koji imaju puno veće čestice i čija je topljivost primjetno lošija.
3. Proteini riže pokazali su sposobnost pjenjenja vrlo sličnu proteinima sirutke te su među ispitanim biljnim proteinima pokazali najveću sposobnost pjenjenja i najveću stabilnost pjene.
4. Biljni proteini u usporedbi s proteinima sirutke pokazali su se kao lošiji emulgatori, zbog niske sposobnosti biljnih proteina za reorijentaciju na granici faza i posljedično niske sposobnosti za održavanje stabilne emulzije.
5. Proteini graška pokazali su najveću sposobnost vezanja vode, a proteini sirutke su zbog jako dobre topljivosti pokazali najnižu sposobnost vezanja vode jer su se u potpunosti otopili u vodi.
6. Sposobnost vezanja ulja biljnih proteina vrlo je slična proteinima sirutke. Pokožica kave je pokazala najveću sposobnost vezanja ulja, a najnižu sposobnost je pokazao grašak.
7. Stabilnost suspenzija biljnih proteina jednaka je i nakon 24h, odnosno nakon određenog vremena ne dolazi do promjena u stabilnosti suspenzija proteina.
8. Suspenzije proteina graška, riže, konoplje, sirutke i pokožica kave su stabilne u rasponu temperatura od  $20^\circ\text{C}$  do  $60^\circ\text{C}$  te pri tim temperaturama ne dolazi do utjecaja na suspenziju. Povećanjem temperature od  $20^\circ\text{C}$  do  $60^\circ\text{C}$  dolazi do pada vrijednosti zeta potencijala kod suspenzije proteina boba, no prema statističkoj analizi podataka taj utjecaj nije statistički značajan.
9. Najveći zeta potencijal, odnosno najveću stabilnost suspenzije u usporedbi s proteinima sirutke pokazali su proteini konoplje, dok su proteini riže i pokožica kave pokazali podjednake vrijednosti. Proteini boba i graška pokazali su se kao najnestabilnije suspenzije.
10. Najveću površinsku hidrofobnost pokazali su proteini graška, a prate ga proteini boba i riže. Proteini graška, boba i riže ujedno su pokazali veću površinsku hidrofobnost u usporedbi s proteinima sirutke.

11. Ono što je podjednako svim ispitanim biljnim proteinima je niska sposobnost održavanja emulzija, stoga je to jedina funkcija koju biljni proteini ne bi mogli obaviti bez pomoći emulgatora. No, potrebno je napraviti dodatna istraživanja na način da se izvori biljnih proteina tretiraju novim netermalnim tehnologijama koje bi također mogle poboljšati njihova funkcionalna svojstva i povećati stabilnost.
12. Rezultati dobiveni analizom biljnih proteina se statistički značajno razlikuju u odnosu na rezultate proteina sirutke ( $p < 0,05$ ), ali isto tako, statistički značajna razlika dokazana je i među rezultatima biljnih proteina. To dovodi do zaključka da svaki biljni protein ima određeno svojstvo u kojem pokazuje bolje ili lošije rezultate pa ih se prema tome treba kategorizirati i iskorištavati svojstva koja su im dokazano najbolja.
13. Ovim je radom također dokazano da se nusproizvod prehrambene industrije, pokožica kave, može iskoristiti kao odličan izvor proteina čija se svojstva mogu uspoređivati sa svojstvima proteina sirutke.

## 7. ZAHVALA

*Za početak se neizmjerljivo zahvaljujem prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak na pruženoj prilici, svim savjetima i pomoći pri izradi rada te svom prenesenom znanju.*

*Veliko hvala i asistentici Marineli Nutrizio, mag. nutr. na vremenu koje je izdvojila da bi odgovorila na svako moje pitanje te hvala na korisnim savjetima i nesebičnoj pomoći pri izradi rada.*

*Također, zahvaljujem se i doc. dr. sc. Filipu Šupljiki (Zavod za kemiju i biokemiju, Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju) na ustupljenim uređajima za mjerenje te pomoći pri izradi ovog rada.*

*I jedno veliko hvala Anton Paar Croatia d.o.o. na ustupljenom uređaju (Litesizer 500).*

## 8. LITERATURA

Abdul-Rahman, F. (2014) Reduce, Reuse, Recycle: Alternatives for Waste Management. U: Guide (New Mexico State University), Las Cruces, New Mexico, 314.

Adams, W.M. (2006) The future of sustainability. Re-thinking environment and development in the twenty-first century. < <https://portals.iucn.org/library/node/12635>> Pristupljeno: 21.05.2021.

Akhtar, A.Z., Greger, M., Ferdowsian, H., Frank, E. (2009) Health Professionals' Roles in Animal Agriculture, Climate Change, and Human Health. *Am. J. Prev. Med.* **36**, 182-187.

Aluko, R.E. (2017) Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Proteins: Composition, Structure, Enzymatic Modification, and Functional or Bioactive Properties. U: Sustainable Protein Sources, (Nadathur, S.R., Wanasundara, J.P.D., Scanlin, L., ured.), Academic Press, UK/SAD, str. 121-132.

Aluko, R.E., Mofolasayo, O., Watts, B.M. (2009) Emulsifying and Foaming Properties of Commercial Yellow Pea (*Pisum sativum* L.) Seed Flours. *J. Agr. Food Chem.* **57**, 9793-9800.

Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A.L., O'Mahony, J.A. (2016) Physical and flow properties of rice protein powders. *J. Food Eng.* **190**, 1-9.

Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A.L., O'Mahony, J.A. (2017) The composition, extraction, functionality, and applications of rice proteins: a review. *Trends Food Sci. Tech.* **64**, 1-12.

Andrade, J., Pereira, C.G., Almeida, J.C., Viana, C.C.R., Oliveira Neves, L.N., Silva, P.H.F., Bell, M.J.V., Carvalho dos Anjos, V. (2018) FTIR-ATR determination of protein content to evaluate Whey Protein Concentrate adulteration. *LWT - Food Science and Technology.* **99**, 166-172.

Anonymus 1 (datum nepoznat) <<https://www.pngjoy.com/fullpng/o8v3r5a1a1k9s8/>> Pristupljeno: 20.04.2021.

Anonymus 2 (datum nepoznat) <<https://www.gettyimages.com/detail/photo/cannabis-hemp-seeds-close-up-macro-shot-isolated-royalty-free-image/1060183418>> Pristupljeno 20.04.2021.

Anonymus 3 (datum nepoznat) Ways to use Whey.

<<https://cheesemaking.com/blogs/learn/whey-dont-throw-it-awhey>> Pristupljeno: 20.04.2021.

Auri (2019) Hemp as a Food Product. Auri – Agricultural Utilization Research Institute. <[https://www.auri.org/wp-content/uploads/2019/08/AURI\\_Hemp\\_OnePage\\_Food\\_4.pdf](https://www.auri.org/wp-content/uploads/2019/08/AURI_Hemp_OnePage_Food_4.pdf)>

Pristupljeno: 11.05.2021.

Aydemir, L.Y. i Yemenicioglu, A. (2013) Potential of Turkish Kabuli type chickpea and green and red lentil cultivars as source of soy and animal origin functional protein alternatives. *LWT - Food Science and Technology*, **50**, 686–694.

Balandra'n-Quintana, R.R., Mendoza-Wilson, A.M., Montfor, G.R.C., Huerta-Ocampo, J.A. (2019) Plant-Based Proteins. U: Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications, (Galanakis, C.M., ured.), Academic Press, UK/SAD, str. 97-130.

Barač, M.B., Pešić, M.B., Stanojević, S.P., Kostić, A.Ž., Čabrilo, S.B. (2015) Techno-functional properties of pea (*Pisum Sativum*) protein isolates- a review. *Acta Periodica Technologica*. **50**, 1-18.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Gatto, G.J., Stryer, L. (2019) Biochemistry, 9. izdanje, WH Freeman, SAD.

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.

Borić, N. i Ivankić, D. (2015) Leksikon hranjivih tvari, Leo commerce, Rijeka, str. 99-125.

Burgstaller, C. i Etchart, N. (2021) Effect of pH on the Stability of Intravenous Emulsions: Relevance of Zeta Potential and Particle Size Measurements. <<https://www.anton-paar.com/corp-en/services-support/document-finder/application-reports/effect-of-ph-on-the-stability-of-intravenous-emulsions-relevance-of-zeta-potential-and-particle-siz/>> Pristupljeno: 12.05.2021.

Chandi, G.K. i Sogi, D.S. (2006) Functional properties of rice bran protein concentrates. *J. Food Eng.* **79**, 592-597.

Chaudhuri, T.K., Das, K.P., Sinha, N.K. (1993) Surface Hydrophobicity of a Low Molecular Weight Basic Trypsin Subtilisin Inhibitor from Marine Turtle Eggwhite. *J. Biochem.* **113**, 729-733.

Chiremba, C., Vandenberg, A., Smits, J. Samaranazaka, A., Lam, R., Hood-Niefer, S. (2018) New Opportunities for Faba Bean. *Cereal Food World*. **63**, 221-222.

- Deeth, H. i Bansal, N. (2019) Whey Proteins: An Overview. U: Whey Proteins; From Milk to Medicine, (Deeth, H.C., Bansal, N., ured.), Academic Press, UK/SAD, str. 1-50.
- Deshpande, M. i Sathe, S.K. (2018) Interactions with 8-Anilinoanthracene-1-Sulfonic Acid (ANS) and Surface Hydrophobicity of Black Gram (*Vigna mungo*) Phaseolin. *J. Food Sci.* **83**, 1847-1855.
- Erwin J. (datum nepoznat) Pea (*Pisum sativum*). < <https://www.plantgrower.org/pea.html>> Pristupljeno: 20.04.2021.
- FAO (2021) Global Livestock Environmental Assessment Model (GLEAM). FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. <[www.fao.org/gleam/en/](http://www.fao.org/gleam/en/)> Pristupljeno: 21.04.2021.
- Fike, J. (2016) Industrial Hemp: Renewed Opportunities for an Ancient Crop. *Crit. Rev. Plant Sci.* **35**, 406-424.
- Frajman-Jakšić, A., Ham, M., Redek, T. (2010) Sreća i ekološka svjesnost – čimbenici održivog razvoja. *Ekonomski vjesnik.* **23**, 467-481.
- Friganović, E., Runje, M., Ujaković, S., Dorbić, B., Šarolić, M., Ćurić, D., Krička, T. (2019) Senzorska procjena tjestenine obogaćene proteinima konoplje i graška. *Glasiilo Future*, **2**, 23-43.
- Ge, J., Sun, C.X., Corke, H., Gul, K., Gan, R.Y. (2020) The health benefits, functional properties, modifications, and applications of pea (*Pisum sativum* L.) protein: Current status, challenges, and perspectives. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **19**, 1835-1876.
- Godfray, H.C.J. (2019). Meat: The future series – alternative proteins. <[http://www3.weforum.org/docs/WEF\\_White\\_Paper\\_Alternative\\_Proteins.pdf](http://www3.weforum.org/docs/WEF_White_Paper_Alternative_Proteins.pdf)> Pristupljeno: 21.4.2021.
- Gorissen, S.H.M., Crombag, J.J.R., Senden, J.M.G., Waterval, W.A.H., Bierau, J., Verdijk, L.B., Loon, L.J.C. (2018) Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates. *Amino Acids.* **50**, 1685-1695.
- Grossi, G., Goglio, P., Vitali, A., Williams, A.G. (2019) Livestock and climate change: impact of livestock on climate and mitigation strategies. *Animal Frontiers.* **9**, 69-76.

Haque, M.A., Timilsena, Y.P., Adhikari, B. (2016) Food Proteins, Structure, and Function. U: Reference modul in Food Science, Elsevier, Nizozemska/UK/SAD.

Hicks, T.M. i Verbeek, C.J.R. (2016) Protein-Rich By-Products: Production Statistics, Legislative Restrictions, and Management Options. U: Protein Byproducts; Transformation from Environmental Burden Into Value-Added Products, (Dhillon, G.S., ured.), Academic Press, UK/SAD, str. 1-18.

Hoogenkamp, H., Kumagai, H., Wanasundara, J.P.D. (2017) Rice Protein and Rice Protein Products. U: Sustainable Protein Sources, (Nadathur, S.R., Wanasundara, J.P.D., Scanlin, L., ured.), Academic Press, UK/SAD, str. 47-65.

Iriondo-DeHond, M., Miguel, E., del Castillo, M.D. (2018) Food Byproducts as Sustainable Ingredients for Innovative and Healthy Dairy Foods. *Nutrients*. **10**(10), 1358.

Iyer, V., Cayatte, C., Guzman, B., Schneider-Ohrum, K., Matuszak, R., Snell, A., Rajani, G.M., McCarthy, M., Muralidhara, B. (2015) Impact of formulation and particle size on stability and immunogenicity of oil-in-water emulsion adjuvants. *Hum. Vacc. Immunother.* **11**, 1853-1864.

Jethwa, F., Shetty, P., Dabade, A. (2018) Extraction and Functional Properties of Crude Proteins from Coffee Silver Skin and its Cost Effective Application. *RJLBPCS*. **50**(15), 252-262.

Joseph, E., i Singhvi, G. (2019) Multifunctional nanocrystalsfor cancer therapy: a potential nanocarrier. U: Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy, (Grumezescu, A.M., ured.), Elsevier, Nizozemska/UK/SAD, str. 91-116.

Karaca, A.C., Low, N., Nickerson, M. (2011) Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Res. Int.* **44**, 2742-2750.

Karche, T., i Singh, M.R. (2019) The application of hemp (*Cannabis sativa* L.) for a green economy: a review. *Turk. J. Bot.* **43**, 710-723.

Karwacka, M., Ciużyńska, A., Lenart, A., Janowicz, M. (2020) Sustainable Development in the Agri-Food Sector in Terms of the Carbon Footprint: A Review. *Sustainability*, **12**(16).

Keivaninahr, F., Gadkari, P., Benis, K.Z., Tulbek, M., Ghosh, S. (2021) Prediction of emulsification behaviour of pea and faba bean protein concentrates and isolates from structure–functionality analysis. *RSC Adv.* **11**, 12117-12135.

- Khan, S.H., Butt, M.S., Sharif, M.K., Sameen, A., Mumtaz, S., Sultan, M.T. (2011) Functional Properties of Protein Isolates Extracted from Stabilized Rice Bran by Microwave, Dry Heat, and Parboiling. *J. Agri. Food Chem.* **59**, 2416-2420.
- Khazaei, H., i Vandenberg, A. (2020) Seed Mineral Composition and Protein Content of Faba Beans (*Vicia faba* L.) with Contrasting Tannin Contents. *Agronomy*. **10**(4), 511.
- Kiš, G. (2016.): Krmiva u hranidbi domaćih životinja. *Gospodarski list*, 39-49.
- Klingel, T., Kremer, J.I., Gottstein, V., Rezende, T.R., 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.
- Krolczyk, J.B., Dawidziuk, T., Janiszewska-Turak, E., Solowiej, B.G. (2016): Use of whey and whey preparations in the food industry- A review. *Polish J. Food Nutr. Sci.* **66**, 157-165.
- Kumar, M., Dutta, S., You, S., Luo, G., Zhang, S., Show, P.L., Sawarkar, A.D., Singh, L., Tsang, D.C.W. (2021) A critical review on biochar for enhancing biogas production from anaerobic digestion of food waste and sludge. *J. Clean Prod.* **305**, 127143.
- Lam, A.C.Y., Karaca, A.C., Tyler, R.T., Nickerson, M.T. (2016) Pea protein isolates: structure, extraction and functionality. *Food Rev. Int.* **34**, 126-147.
- Lam, R.S.H. i Nickerson, M.T. (2014) The effect of pH and temperature pre-treatments on the physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate. *LWT – Food, Science and Technology*. **60**, 427-434.
- Lee, C.H. (2010) 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS); a versatile fluorescent probe from protein folding study to drug design. *BioWave*. **12**(6).
- Lu, Z.X., He, J.F., Zhang, Y.C., Bing, D.J. (2019) Composition, physicochemical properties of pea protein and its application in functional foods. *Crit. Rev. Food Sci.* **60**, 2593-2605.
- Machado, S., Costa, A.S.G., Pimentel, B.F., Oliveira, M.B.P.P., Alves, R.C. (2020) A study on the protein fraction of coffee silverskin: Protein/non-protein nitrogen and free and total amino acid profiles. *Food Chem.* **326**, 126940.
- Malomo, S.A. i Aluko, R.E. (2014) A comparative study of the structural and functional properties of isolated hemp seed (*Cannabis sativa* L.) albumin and globulin fractions. *Food Hydrocolloids*. **43**, 743-752.



- Malomo, S.A. i Aluko, R.E. (2015) Conversion of a low protein hemp seed meal into a functional protein concentrate through enzymatic digestion of fibre coupled with membrane ultrafiltration. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **31**, 151–159.
- Malomo, S.A., He, R., Aluko, R.E. (2014) Structural and Functional Properties of Hemp Seed Protein Products. *J. Food Sci.* **79**, 1512-1521.
- Malvern Instruments Limited (2015) Zeta potential - An introduction in 30 minutes. <<https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/technical-notes/TN101104ZetaPotentialIntroduction>> Pristupljeno: 12.04.2021.
- Mandial, D., Khullar, P., Mahal, A., Kumar, H., Singh, N., Ahluwalia, K.G., Bakshi, M.H. (2018) Applications of rice protein in nanomaterials synthesis, nanocolloids of rice protein, and bioapplicability. *Int. J. Biol. Macromol.* **120**, 394-404.
- 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.
- Martínez-Velasco, A., Lobato-Calleros, C., Hernández-Rodríguez, B.E., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E.J. (2018) High intensity ultrasound treatment of faba bean (*Vicia faba* L.) protein: Effect on surface properties, foaming ability and structural changes. *Ultrasonics Sonochemistry.* **44**, 97-705.
- Matijević, B. (2018) Possibilities in whey utilization and disposal. Prva internacionalna konferencija: „The Holistic Approach to Environment“, str. 438-449.
- Mermelstein, N.H. (2016) Sizing Up Particles. *Food Tech.* **70**(8).
- Ministarstvo vanjskih i europskih poslova (2015) Održivi razvoj <<http://www.mvep.hr/hr/vanjska-politika/multilateralni-odnosi0/globalne-teme/odrzivi-razvoj/>> Pristupljeno: 31.05.2021.
- Mohanta, T.K., Khan, A., Hashem, A., Abd-Allah, E.F., Al-Harrasi, A. (2019) The molecular mass and isoelectric point of plant proteomes. *BMC Genomics.* **20**(1), 631.
- Moro, A., Gatti, C., Delorenzi, N. (2001) Hydrophobicity of Whey Protein Concentrates Measured by Fluorescence Quenching and Its Relation with Surface Functional Properties. *J. Agri. Food Chem.* **49**, 4784-4789.

- Morr, C.V. i Foegeding, E.A. (1990): Composition and Functionality of Commercial Whey and Milk Protein Concentrates and Isolates: A Status Report'. *Food Tech.* **44**,100-112.
- Mortuza, G., Hannan, A., Tzen, J. (2009) Chemical composition and functional properties of *Vicia faba* L. from Bangladesh. *Bangl. J. Bot.* **38**, 93-97.
- Nastaj, M. i Sołowiej, B.G. (2020) Effect of various pH values on foaming properties of whey protein preparations. *Int. J. Dairy Tech.* **73**, 683-694.
- Notarnicola, B., Tassielli, G., Renzulli, P.A., Giudice, A.L. (2015) Life Cycle Assessment in the agri-food sector: an overview of its key aspects, international initiatives, certification, labelling schemes and methodological issues. U: Life Cycle Assessment in the Agri-food Sector, (Notarnicola B., Salomone R., Petti L., Renzulli P., Roma R., Cerutti A., ured.), Springer, Švicarska, str. 1-56.
- Oreopoulou, V. i Tzia, C. (2007) Utilization of Plant By-Products for the Recovery of Proteins, Dietary Fibers, Antioxidants, and Colorants. U: Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry, (Oreopoulou V., Russ W., ured.), Springer, Boston, str. 209-232.
- Owusu-Ansah, Y.J. i McCurdy, S.M. (1991) Pea proteins: a review of chemistry, technology of production, and utilization. *Food Rev. Int.* **7**, 103-134.
- Papanikou E. (2020) Fava beans an alternative protein source in layer feeds. <<https://www.feedstrategy.com/blog/fava-beans-an-alternative-protein-source-in-layer-feeds/>> Pristupljeno: 20.04.2021.
- Paraman, I., Hettiarachchy, N.S., Schaefer, C., Beck, M.I. (2007) Hydrophobicity, Solubility, and Emulsifying Properties of Enzyme-Modified Rice Endosperm Protein. *Cereal Chem.* **84**, 343-349.
- Peters, J.P.C.M. (2016) Water-Binding of Protein Particles. Doktorski rad, Wageningen University, Wageningen.
- Petrillo, B. i Wu, M. (2021) Molecular Mass of Lysozyme Determined by SLS. <<https://www.anton-paar.com/corp-en/services-support/document-finder/application-reports/molecular-mass-of-lysozyme-determined-by-sls/>> Pristupljeno: 12.05.2021.
- Pimentel, D. i Pimentel, M. (2003) Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**, 660S-663S.

- Roorda, N., Corcoran, P.B., Weakland, J.P., Beckers, A.M., Grin, J., Jansen, J.L.A., Martens, P., Rabbinge, R., Slingerland, M.A., Wempe, J.F.D.B. (2017) Fundamentals of Sustainable Development, 2. izdanje, Routledge, UK.
- Rubio, L.A., Pérez, A., Ruiz, R., Guzmán, M.A., Aranda-Olmedo, I., Clemente, A. (2013) Characterization of pea (*Pisum sativum*) seedprotein fractions. *J. Sci. Food Agric.* **94**, 280-287.
- Sajib, M., Albers, E., Langeland, M., Undeland, I. (2020) Understanding the effect of temperature and time on protein degree of hydrolysis and lipid oxidation during ensilaging of herring (*Clupea harengus*) filleting co-products. *Sci. Rep.* **10**, 9590.
- Sha, L. i Xiong, Y.L. (2020) Plant protein-based alternatives of reconstructed meat: Science, technology, and challenges. *Trends Food Sci. Tech.* **102**, 51-61.
- Sharan, S., Zanghelini, G., Zotzel, J., Bonerz, D., Aschoff, J., Saint-Eve, A., Maillard, M.N. (2020) Fava bean (*Vicia faba* L.) for food applications: From seed to ingredient processing and its effect on functional properties, antinutritional factors, flavor, and color. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **20**, 401-428.
- Shen, X., Shao, S., Guo, M. (2016) Ultrasound-induced changes in physical and functional properties of whey proteins. *Int. J. Food Sci. Tech.* **52**, 381-388.
- Sikorski, Z.E. (2019) Chemical and Functional Properties of Food Components, 3. izdanje, CRC Press, UK.
- Søbye, A., Kolding, A., Lund, M.L.K., Jensen, M.D. (2015) Protein Stability. School of Engineering and Science, Aalborg University.
- Song, Q., Li, J., Zeng, X. (2014) Minimizing the increasing solid waste through Zero waste strategy. *J. Clean Prod.* **104**, 199-210.
- Sun, X.M., Wang, C.N., Guo, M.R. (2018) Interactions between whey protein or polymerized whey protein and soybean lecithin in model system. *J. Dairy Sci.* **101**, 1-13.
- Teh S.S., Bekhit A.E.D.A., Carne A., Birch, J. (2016) Antioxidant and ACE-inhibitory activities of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates produced by the proteases AFP, HT, pro-G, actinidin and zingibain. *Food Chem.* **203**, 199–206.
- Tömösközi, S., Lásztity, R., Haraszi, R., Baticz, O. (2001) Isolation and study of the functional properties of pea proteins. *Nahrung.* **45**, 399-401.

- Vihinen, M. (2020) Solubility of proteins. *ADMET & DMPK*. **8**, 391-399.
- Vioque, J., Alaiz, M., Girón-Calle, J. (2012) Nutritional and functional properties of *Vicia faba* protein isolates and related fractions. *Food Chem.* **132**, 67-72.
- Vogelsang-O'Dwyer, M., Petersen, I.L., Joehnke, M.S., Sørensen, J.C., Bez, J., Detzel, A., Busch, M., Krueger, M., O'Mahony, J., Arendt, E.K. Zannini, E. (2020) Comparison of Faba Bean Protein Ingredients Produced Using Dry Fractionation and Isoelectric Precipitation: Techno-Functional, Nutritional and Environmental Performance. *Foods*. **9**(3), 322.
- Wang, C., Xu, F., Li, D., Zhang, M. (2015) Physico-chemical and Structural Properties of Four Rice Bran Protein Fractions Based on the Multiple Solvent Extraction Method. *Czech J. Food Sci.* **33**, 283-291.
- Warkentin, T.D., Smýkal, P., Coyne, C.J., Weeden, N., Domoney, C., Bing, D.J., Leonforte, A., Xuxiao, Z., Dixit, G.P., Boros, L., McPhee, K.E., McGee, R.J., Burstin, J., Ellis, T.H.N. (2015) Pea. U: Grain Legumes; Handbook of Plant Breeding, (De Ron, A.M., ured.), Springer, New York, str. 37-83.
- Webb, M.F., Naeem, H.A., Schmidt, K.A. (2002) Food Protein Functionality in a Liquid System: A Comparison of Deamidated Wheat Protein with Dairy and Soy Proteins. *J. Food Sci.* **67**, 2896-2902.
- Wei Lu, G. i Gao, P. (2010) Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. U: Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems, (Kulkarni, V.S., ured.), William Andrew, UK/SAD, str. 59-94.
- Wen, L., Álvarez, C., Zhang, Z., Poojary, M.M., Lund, M.N., Sun, D.W., Tiwari, B.K. (2020) Optimisation and characterisation of protein extraction from coffee silverskin assisted by ultrasound or microwave techniques. *Biomass Conv. Bioref.*
- Xiong, L., Li, C., Boeren, S., Vervoort, J., Herringa, K., (2020) Effect of heat treatment on bacteriostatic activity and protein profile of bovine whey proteins. *Food Res. Int.* **127**, 108688.
- Xu, M., Jin, Z., Gu, Z., Rao, J., Chen, B. (2020) Changes in odor characteristics of pulse protein isolates from germinated chickpea, lentil, and yellow pea: role of lipoxygenase and free radicals. *Food Chem.* **314**, 126184.

Yin, S.W., Tang, C.H., Wen, Q.B., Yang, X.Q. (2007) Properties of Cast Films from Hemp (*Cannabis sativa* L.) and Soy Protein Isolates. A Comparative Study. *J. Agr. Food Chem.* **55**, 7399-7404.

Zhao, H., Shen, C., Zhang, Z., Xu, C. (2020) Comparison of wheat, soybean, rice, and pea protein properties for effective applications in food products. *J. Food Biochem.* **44**(4).

Żuk-Gołaszewska, K. i Gołaszewski, J. (2020) Hemp Production. U: Sustainable Agriculture Reviews 42; Hemp Production and Applications, (Crini, G., Lichtfouse, E., ured.), Springer, Švicarska, str. 1-36.

## FUNKCIONALNA SVOJSTVA BILJNIH PROTEINA I ASPEKT ODRŽIVE PRIMJENE

### SAŽETAK

Zadnjih nekoliko godina svijet se fokusira na održivi razvoj pa se tako i prehrambena industrija fokusira na održivu proizvodnju. To je naročito bitno kada je riječ o životinjama jer je poznato da su one jedni od glavnih proizvođača emisijskih plinova. Osim toga, za njihovu prehranu potrebno je na velikim površinama zemlje sijati monokulture žitarica, zbog čega dolazi do krčenja šuma, gubitka biološke raznolikosti i iscrpljivanja vodenih resursa. Ovaj problem nastoji se riješiti na način da se potrošnja životinjskih proteina postepeno zamijeni biljnim proteinima. Cilj ovog rada bio je ispitati funkcionalna svojstva i karakteristike pet različitih biljnih izvora proteina (grašak, riža, bob, konoplja, pokožica kave) te ih usporediti s najčešće korištenim životinjskim proteinom, sirutkom. Osim toga, uzorak pokožice kave predstavlja nusproizvod industrije proizvodnje kave koji može poslužiti kao odličan izvor proteina. Iskorištavanjem nusproizvoda prehrambene industrije i povećanjem svijesti o njihovom nutritivnom bogatstvu i funkcionalnim svojstvima, održiva proizvodnja u prehrambenoj industriji bila bi potpuna, a količina otpada i nusproizvoda svela bi se na minimum. U ovom radu provedene su analize na količinu proteina, veličinu čestica i molekularnu masu, ispitana su razna funkcionalna svojstva kao što su pjenjenje, emulgiranje, sposobnost vezanja vode i ulja. Određen je i zeta potencijal u rasponu temperatura od 20°C do 60°C te je određena površinska hidrofobnost proteina. Rezultati su pokazali da su funkcionalna svojstva biljnih proteina usporediva s funkcionalnim svojstvima proteina sirutke. Proteini riže pokazali su najbolja svojstva i stabilnost pjenjenja, proteini graška pokazali su najbolju sposobnost vezanja vode, dok je sposobnost vezanja ulja bila najveća kod uzorka pokožice kave. Jedino svojstvo u kojem su se svi biljni proteini pokazali lošijima jest stabilnost emulzije. U tom slučaju, bilo bi potrebno koristiti emulgator ili novim netermalnim tehnologijama djelovati na biljne proteine na način da im se poboljšaju svojstva. Ispitivanjem hidrofobnosti, proteini graška, boba i riže pokazali su se hidrofobnijim u usporedbi s proteinima sirutke. Analizom zeta potencijala utvrdilo se da samo proteini graška i boba imaju manju stabilnost suspenzije u usporedbi s proteinima sirutke, a osim toga utvrđeno je da temperatura do 60°C nema negativan utjecaj na stabilnost suspenzija biljnih proteina.

**Ključne riječi:** proteini, biljni proteini, održivi razvoj, nusproizvod prehrambene industrije, funkcionalna svojstva

Angela Božić

## FUNCTIONAL PROPERTIES OF PLANT PROTEINS AND ASPECT OF SUSTAINABLE APPLICATION

### SUMMARY

Over the last few years, the world has been focused on sustainable development which has been echoed by the food industry and its focus on sustainable production. That is especially important when it comes to animal agriculture, since it is known that they are one of the largest producers of greenhouse gasses. Furthermore, in order to meet their nutritional needs, monocultures of grains must be sown on large areas of land causing deforestation, loss of biodiversity, and depletion of water resources. One of the proposed attempts to solve this problem is the replacement of animal proteins with plant proteins. The aim of this research is to examine the functional properties and characteristics of five different plant resources (green pea, rice, faba bean, hemp, coffee silverskin) and to compare them with the most used animal protein in the food industry - whey protein. Furthermore, the sample of coffee silverskin is a byproduct in the food industry that can be used as a great source of proteins. By using byproducts and increasing awareness of their nutritional richness and functional properties, sustainable development in the food industry would be complete and the amount of food waste and food byproducts would be reduced to a minimum. In this research, analyses of protein content, particle size, and molecular weight were carried out. Various functional properties were also examined such as foaming properties, emulsion properties, and water/oil holding capacity. Zeta potential was determined in the temperature range from 20°C to 60°C, as well as the protein surface hydrophobicity. The results showed that the functional properties of plant proteins can be compared to those of whey protein. Rice proteins showed the best properties and foam stability, pea proteins showed the best water holding capacity, while coffee silverskin showed the best oil holding capacity. The only property that showed poor results in all plant proteins is emulsion stability. For that matter, it would be necessary to use an emulsifier or to process plants with new, nonthermal technologies so as to improve their properties. Pea proteins, faba bean proteins, and rice proteins showed higher surface hydrophobicity in comparison to whey proteins. Zeta potential analysis determined that pea and broad bean proteins had lower suspension stability compared to whey proteins and it was also determined that the temperature up to 60°C does not have a negative effect on the suspension stability of plant proteins.

**Key words:** proteins, plant proteins, sustainable development, food industry byproducts, functional properties