

# Funkcionalna svojstva proteina iz maka (Papaver somniferum), industrijske konoplje (Cannabis sativa) i kakaove ljske (Theobroma cacao L.)

---

Soldo, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:756778>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-16**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Nutricionizam

Marija Soldo

6479/N

**FUNKCIONALNA SVOJSTVA PROTEINA IZ MAKA (*Papaver somniferum*), INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*Cannabis sativa*) I KAKAOVE LJUSKE (*Theobroma cacao* L.)**

Modul: Kemija i tehnologija uživala

Mentor: prof.dr.sc. Draženka Komes

Zagreb, 2016

# DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno –biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Nutricionizam  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

## FUNKCIONALNA SVOJSTVA PROTEINA IZ MAKA (*Papaver somniferum*), INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*Cannabis sativa*) I KAKAOVE LJUSKE (*Theobroma cacao* L.)

*Marija Soldo, 6479/N*

**Sažetak:** Sukladno modernim trendovima u prehrani i sve većim zahtjevima tržišta i potrošača za namirnicama biljnoga porijekla, danas je velik broj znanstvenih istraživanja posvećen pronalasku alternativnih izvora proteina iz biljnih sirovina. U ovom radu ispitana je mogućnost izolacije i karakterizacije proteina iz triju biljnih sirovina (mak, konoplja, kakaova ljuska) bogatog nutritivnog i proteinskog sastava. Za izolaciju proteina primijenjeni su postupci alkalne hidrolize na dvije različite temperature (sobna i 75°C) te precipitacije pri izoelektričnoj točki proteina. Učinkovitost postupaka izolacije proteina određena je prinosom proteina te određivanjem udjela proteina u izdvojenim proteinskim frakcijama, dok su istima karakterizirana funkcionalna svojstva (topljivost, svojstva pjenjenja, električne provodljivosti, kapacitet vezanja vode i ulja te svojstva emulzifikacije).

Prema dobivenim rezultatima određivanja osnovnog kemijskog sastava biljnih sirovina konoplja je najbogatiji izvor proteina, mak masti, a kakaova ljuska ugljikohidrata. Najveći prinos proteinske frakcije dobiven je izolacijom proteina iz maka (~12,5%), potom iz kakaove ljuske (~7,9%) dok je najmanji prinos dobiven izolacijom proteina iz konoplje (~4,3%). Postupkom izolacije pri 75°C dobiva se veći prinos proteina i njihov udio u izdvojenim proteinskim frakcijama, u odnosu na izolaciju pri sobnoj temperaturi. Topljivost izdvojenih proteinskih frakcija bolja je pri sobnoj temperaturi, te raste porastom pH vrijednosti. Svojstva pjenjenja, vezanja ulja i vode te provodljivosti općenito su bolja za proteinske frakcije dobivene izolacijom pri 75°C. Ovim radom dokazan je velik potencijal i izvrsna funkcionalna svojstva frakcija izdvojenih iz svih triju biljnih sirovina, no potrebna su dodatna ispitivanja kako bi se odredila njihova točna strukturna i funkcionalna svojstva.

**Ključne riječi:** funkcionalna svojstva, izolacija, kakaova ljuska, konoplja, mak, proteinske frakcije

**Rad sadrži:** 34 stranice, 13 slika, 3 tablice, 29 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof.dr.sc. Draženka Komes

**Pomoć pri radnji:** doc. dr. sc. Ana Belščak-Cvitanović

**Rad predan:** rujan, 2016.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**Final work**

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Undergraduate studies of Nutrition**  
**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Technology of Carbohydrates and Confectionery Products**

### **FUNCTIONAL PROPERTIES OF POPPY (*Papaver somniferum* L.), INDUSTRIAL HEMP (*Cannabis sativa* L.) and COCOA HUSK (*Theobroma cacao* L.) PROTEINS**

*Marija Soldo, 6479/N*

**Abstract:** Along with the modern dietary trends and growing market and consumer demands for plant based foods, today a great number of scientific research is conducted on finding alternative, plant derived protein sources. In this study the potential of isolation and characterization of proteins from three plant sources (poppy, hemp and cocoa husk) was examined. For the protein isolation, alkaline hydrolysis at two different temperatures (room and 75°C) and precipitation at the isoelectric point of proteins was employed. The efficiency of protein isolation procedures was determined by the protein yield measurement as well as protein content determination in the isolated fractions, while their functional properties were also characterized (solubility, foaming properties, electrical conductivity, oil and water binding capacity, emulsification activity).

According to the chemical composition of selected plant materials hemp was the most abundant source of proteins, poppy seeds of fat and cocoa husk of carbohydrates. The highest protein yield was obtained by isolation from poppy (~12,5%), then from cocoa husk (~7,9%), while the lowest protein yield was recovered from hemp (~4,3%). By isolation at 75°C higher protein yield and their content in the isolated fractions were obtained. The solubility of proteins was improved at room temperature and increased with the increase of the pH value. Other physico-chemical properties were generally higher for protein fractions recovered at 75°C. This study revealed a great potential and excellent functional properties of fractions recovered from all plant sources, however further examinations are required to determine their exact structural and functional properties.

**Keywords:** functional properties, isolation, cocoa husk, hemp, poppy, protein fractions

**Thesis contains:** 34 pages, 13 figures, 2 tables, 29 references

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačiceva 23, Zagreb

**Mentor:** PhD Draženka Komes, Full Professor

**Technical support and assistance:** PhD Ana Belščak-Cvitanović, Assistant Professor

**Thesis delivered:** September 2016

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Definicija proteina.....	2
2.2. Funkcionalna svojstva proteina .....	2
2.3. Analitički postupci izolacije proteina .....	4
2.3.1. Uništenje stanice .....	4
2.3.2. Otapanje proteina.....	5
2.3.3. Hidroliza proteina .....	5
2.3.4. Centrifugiranje i taloženje proteina .....	5
2.4. Biljne sirovine kao izvori proteina .....	6
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	9
3.1. Materijal .....	9
3.1.1. Kemikalije.....	9
3.1.2. Aparatura i pribor .....	9
3.2. Metode.....	10
3.2.1. Karakterizacija osnovnog kemijskog sastava sirovina .....	10
3.2.2. Frakcijska izolacija proteina.....	11
3.3. Karakterizacija funkcionalnih svojstava izdvojenih proteinskih frakcija.....	13
3.3.1. Ispitivanje topljivosti proteina.....	13
3.3.2. Kapacitet i stabilnost pjenjenja .....	14
3.3.3. Električna provodljivost .....	14
3.3.4. Kapacitet vezanja vode i ulja .....	15
3.3.5. Indeks aktivnosti emulzifikacije (EAI) i indeks razdvajanja emulzije (ESI) .....	15
4. REZULTATI.....	16
4.1. Osnovni kemijski sastav sirovina .....	17
4.2. Prinos i udio izoliranih proteinskih frakcija iz ispitivanih sirovina.....	18
4.3. Fizikalno-kemijska svojstva proteina .....	19
4.3.1. Topljivost proteina .....	19
4.3.2. Kapacitet i stabilnost pjenjenja .....	19
4.3.3. Električna provodljivost .....	20
4.3.4. Kapacitet vezanja vode i ulja .....	20
4.3.5. Emulzifikacija proteina .....	21
5. RASPRAVA.....	22
5.1. Osnovni kemijski sastav sirovina .....	22
5.2. Prinos i udio proteina .....	22

5.3 Fizikalno-kemijska svojstva proteina.....	23
5.3.1. Topljivost proteina.....	23
5.3.2. Svojstva pjenja izoliranih proteinskih frakcija .....	24
5.3.3. Električna provodljivost .....	24
5.3.4. Kapacitet vezanja vode (WHC) i ulja (FAC).....	25
5.3.5. Emulzifikacija .....	25
6. ZAKLJUČCI.....	27
7. LITERATURA.....	28

## 1. UVOD

Proteini su makromolekule koje sudjeluju u gotovo svim biološkim procesima, a njihove osnovne građevne podjedinice aminokiseline nositelji su njihovih brojnih funkcija. Osim neizostavne uloge u svim metaboličkim procesima, proteine karakterizira širok raspon funkcionalnih svojstava, zahvaljujući kojima su ovi spojevi danas jedni od najčešće primjenjivanih sastojaka u prehrambenoj industriji. Funkcionalna svojstva proteina dijele se na: organoleptička (boja, okus, miris), kinestetička (tekstura, osjet u ustima, zrnatost), hidratacijska (topljivost, vlažnost, bubrenje, apsorpcija vode, zgušnjavanje, sinergija, stvaranje gela), površinska (emulgiranje, pjenjenje, stvaranje filma), reološka/teksturalna (elastičnost, kohezivnost, adhezivnost, rastezljivost, formiranje mreže, agregacija, geliranje) te ostala svojstva (kompatibilnost s aditivima, enzimska, inertnost, izmjena svojstava). Ova svojstva bitna su zbog široke primjene u prehrambenoj industriji: poboljšanja kvalitete proizvoda, produljenja roka trajanja, održavanja stabilnosti proizvoda te postizanja zadovoljavajućih senzorskih svojstava. Zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti, proteini su neizostavan dio ljudske prehrane, no, sukladno sve većim zahtjevima potrošača za sirovinama i namirnicama biljnog porijekla, danas raste interes za unosom proteina koji su sastavni dio ili su izolirani iz biljnih sirovina. Iz biljnih tkiva proteini se izoliraju kako bi se dobili enzimi, pročišćeni enzimi važni za identifikaciju gena te u svrhu proizvodnje visoko vrijednih funkcionalnih sastojaka za primjenu u prehrambenoj industriji, a koji bi služili alternativna uobičajenim proteinima animlanog porijekla. Broj znanstvenih istraživanja na temu izolacije i karakterizacije proteina iz biljnih sirovina sve je veći, pa su do sad proteini izolirani iz soje (Tang i sur., 2006), maka (Eklund i Ågren, 1974), uljane repice (Alashi i sur., 2013), konoplje (Wang i sur., 2007), slanutka (Sanchez-Vioque i sur., 1999), graška (Hernández i sur., 2015) i drugih sirovina.

U ovom radu ispitat će se mogućnost izolacije proteina iz triju biljnih sirovina; maka, kakaove ljuske i konoplje, primjenom postupaka alkalne hidrolize i precipitacije pri izoelektričnoj točki proteina uz ispitivanje utjecaja primjene različite temperature hidrolize na prinos i svojstva izoliranih proteinskih frakcija. Biljnim sirovinama odredit će se osnovni kemijski sastav primjenom standardnih analitičkih postupaka te će se istima ispitati osnovna funkcionalna fizikalno-kemijska svojstva (kapacitet pjenjenja, stabilnost pjene, kapacitet vezanja ulja i vode, kapacitet i stabilnost emulzifikacije, topljivost, provodljivost).

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. Definicija proteina**

Proteini su makromolekule građene od aminokiselina povezanih peptidnim vezama čija svojstva ovise o slijedu aminokiselina koje ih grade. Postoji stotinjak aminokiselina, ali samo je 20 prisutno u proteinima hrane i ljudskog tijela. Te aminokiseline se dijele na esencijalne, uvjetno esencijalne i neesencijalne aminokiseline. Važnu ulogu u svim biološkim procesima imaju upravo proteini. Kao enzimi kataliziraju gotovu sve kemijske reakcije. Proteini su glavne gradivne molekule mišića te tako sudjeluju u pokretanju mišića. Služe za transport i pohranu molekula i iona. Dolaze u obliku hormona i održavaju kiselinsko-baznu ravnotežu. Sudjeluju u obrani organizma kao protutijela imunskog sustava te tako štite organizam od stranih tvari iz drugih organizama. Građeci kompleksnije molekule, kao što je kolagen, koži i kostima daju mehaničku čvrstoću te služe u prijenosu i stvaranju živčanih impulsa (Streyer, 1991).

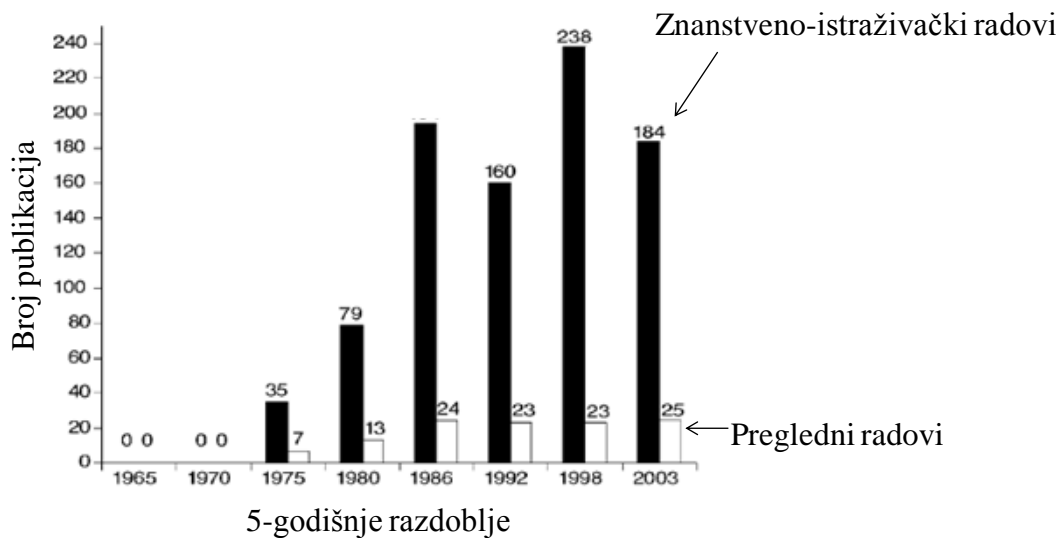
### **2.2. Funkcionalna svojstva proteina**

Razvoj prehrambene industrije doveo je do potrebe za korištenjem sastojaka koji posjeduju veliki broj funkcionalnih svojstava te tako omogućavaju kreiranje novih proizvoda, ali i implementiranje u različite prehrambene proizvode. 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 finalnog produkta (Owusu-Apenten, 2000).

Budući da proteini posjeduju velik broj funkcionalnih svojstava pripadaju najvažnijim funkcionalnim sastojcima. 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 (Kinsella i Melachouris, 1976).



Koliko su ova svojstva bitna, ali i zanimljiva znanstvenicima i prehrambenoj industriji govori broj znanstvenih radova izrađenih na ovu temu, što je prikazano na slici 1.



**Slika 1.** Sažetak publikacija funkcionalnih svojstava proteina od 1965. do 2003. (Owusu-Apenten, 2000)

Tablica 1 prikazuje funkcionalna svojstva proteina u hrani. Različite primjene i aplikacije zahtijevaju različita funkcionalna svojstva proteina pri čemu mnogi proizvodi zahtijevaju cijeli niz specifičnih svojstava. U mnogim slučajevima, proizvodi ovise o promjenama svojstava koja se dešavaju tijekom samog postupka prerade i proizvodnje proizvoda. Primjerice, tijekom formiranja i stabilizacije gela, mora doći do degradacije molekularne strukture proteina te posljedičnih protein-protein interakcija. Prilikom prerade mesa, važna su svojstva adhezije i vezanja vode, posebice svojstva topljivosti, viskoznosti, sposobnosti emulzifikacije i geliranja, kako bi se postigla i osigurala dobra tekstura, zadržavanje oblika te poželjna senzorska svojstva. Sva navedena svojstva obično posjeduje samo nekolicina proteina, stoga je u proizvodnji hrane najčešće potrebno primijeniti smjesu ili mješavinu više vrsta proteina. Prilikom proizvodnje pjena ili emulzija, protein ili smjesa proteina moraju imati dobru površinsku aktivnost te formirati jake, kohezivne, elastične filmove (Kinsella i Phillips, 1989). Također, poželjni su proteini i peptidi koji omogućavaju kemijske interakcije te održavanje ravnoteže između sila privlačenja i odbijanja molekula. Prilikom formiranja

ljena i emulzija proteini koji to omogućuju moraju biti amfifilne i fleksibilne molekule koje se orijentiraju na međufazi ulje-voda te formiraju jake filmove.

**Tablica 1.** Funkcionalna svojstva proteina u hrani (Kinsella i Melachouris, 1976)

Opća svojstva	Funkcionalna svojstva
Organoleptička	boja, okus, miris
Kinestetička	osjet u ustima, tekstura, zrnatost, glatkoća
Hidratacijska	topljivost, vlažnost, apsorpcija vode, bubrenje, zgušnjavanje, viskoznost, sinergija, stvaranje gela/želatine
Površinska	emulgiranje, pjenjenje, stvaranje filma
Reološka/teksturalna	elastičnost, kohezivnost, adhezivnost, rastezljivost, formiranje mreže, agregacija, geliranje
Ostalo	kompatibilnost s aditivima, enzimska, inertnost, izmjena svojstava

### 2.3. Analitički postupci izolacije proteina

Postupak izolacije proteina je kompleksan proces koji se sastoji od nekoliko koraka u kojima se koriste različite metode i koje ovise o izvoru proteina, tj. radi li se o sirovini životinjskog ili biljnog podrijetla te koji dio te sirovine se koristi. Cilj je određene proteine odvojiti od ostalih proteina i neproteinskih komponenti prisutnih u stanicu.

#### 2.3.1. Uništenje stanice

Kako bi proteini postali dostupniji za izolaciju i daljnju analizu potrebno je razoriti stanicu. To je posebno važno kod sirovina biljnog podrijetla, budući da su biljne stanice bogate proteazama i drugim tvarima koje mogu interferirati s proteinima. Metode kojima se postiže uništenje mogu se podijeliti u pet skupina: mehanička homogenizacija, homogenizacija ultrazvukom, tlakom, tretiranje temperaturom te kemijska i osmotska hidroliza.

### ***2.3.2. Otapanje proteina***

Kada proteini postanu dostupni za daljnju analizu provodi se otapanje proteina što se smatra jednim od najvažnijih koraka u izolaciji, budući da se ovdje postiže selektivno odvajanje od ostalih tvari koje mogu interferirati u daljnjoj analizi. Međutim ovaj korak je i veoma zahtjevan zbog velike raznolikosti proteina, ali i samih tvari koje interferiraju. Može se postići uporabom organskih otapala, vodenim otopinama, uporabom enzima te subkritičnom vodom.

### ***2.3.3 Hidroliza proteina***

Hidroliza je postupak degradacije kojim se proteini pucanjem peptidne veze prevode u peptide različitih veličina i slobodne amino-kiseline. Razlikuju se enzimska, kiselinska i alkalna hidroliza. Kiselinska i alkalna hidroliza su oblici kemijske hidrolize koje je teže kontrolirati te rezultiraju produktima smanjene prehrambene vrijednosti. Enzimska hidroliza se odvija pri blagim uvjetima pH (6-8) i temperature (40-60°C). Izbjegavaju se ekstremi koji su uglavnom potrebni za fizikalno-kemijska tretiranja te smanjuju ostale reakcije (Clemente, 2000).

### ***2.3.4. Centrifugiranje i taloženje proteina***

Nakon što je dobivena frakcija proteina provode se postupci kojim se odvajaju proteini od topljivih peptida. Ti postupci mogu biti centrifugiranje, taloženje ili se radi o elektroforetskim i kromatografskim metodama.

#### ***2.3.4.1. Centrifugiranje***

Centrifugiranje je jedna od najjednostavnijih metoda. Odvajanje se vrši na temelju koeficijenta sedimentacije proteina i ovisi o masi, obliku i gustoći proteina. Može se koristiti za različite namjene kao što su odvajanje nepročišćene smjese od staničnih komponenti ili za frakcioniranje smjese proteina u različite frakcije.

#### ***2.3.4.2. Taloženje***

Taloženje proteina uglavnom se postiže dodatkom određene količine lako topljive soli što izaziva porast proteinskih interakcija, popraćen agregacijom proteina te izdvajanjem proteina iz otopine, tj. taloženjem. Ovaj proces se naziva isoljavanje, a koncentracija soli potrebna za taloženje ovisi o vrsti proteina. Imunotaloženje je poseban oblik taloženja temeljen na nastanku kompleksa antigen-antitijelo.

#### 2.3.4.3. Elektroforetske metode

Elektroforeza je metoda odvajanja mješavine proteina na temelju naboja, omjera naboja i mase, veličine ili oblika.

#### 2.3.4.4. Kromatografske metode

Tekućinska kromatografija je često korištena metoda u kojoj se odvajanje proteina postiže na temelju njihova naboja, hidrofobnosti ili veličine. Najčešću primjenu ima kromatografija ionske izmjene gdje se proteini odvajaju na temelju vrijednosti njihove izoelektrične točke.

### **2.4. Biljne sirovine kao izvori proteina**

Kako bi ispunila sve zahtjeve potrošača i tržišta prehrambena industrija danas se okreće brzom proizvodnji kojoj je cilj u što kraćem vremenu proizvesti velike količine finalnih proizvoda. U proizvodnji sirovina i proizvoda za ljudsku prehranu, to vrlo često podrazumijeva uporabu štetnih kemikalija, pesticida, hormona i antibiotika, posebice u proizvodnji namirnica animalnog porijekla. Kao posljedica, broj ljudi koji prestaju konzumirati namirnice životinjskog podrijetla, bilo u potpunosti ili djelomično, stalno se povećava i raste interes znanstvenika za ovu tematiku (Vranešić-Bender, 2007). Također, danas je sve veći broj potrošača koji se odlučuju za prehranu biljnim namirnicama te sastojcima biljnog porijekla u sklopu vegetarijanske i veganske prehrane. Stoga je posljednjih godina iznimno povećana tendencija pronalaska alternativnih, biljnih izvora funkcionalnih sastojaka, posebice proteina.

Proteini se iz biljnih tkiva izoliraju iz više razloga, od potrebe za izdvajanjem određenih enzima, do pročišćavanja enzima za potrebe identifikacije gena. Biljni materijali razlikuju se od animalnih po činjenici da posjeduju čvrstu staničnu stijenku, koja je vrlo često iznimno snažno lignificirana. Osim toga, biljne stanice posjeduju vakuole koje sadrže solubilizirane sekundarne biljne metabolite (posebice polifenolne spojeve), organske kiseline i proteinaze. Vakuole se oštećuju prilikom mehaničkog oštećenja stanice te se oslobađa njihov sadržaj koji

može modificirati, inaktivirati, precipitirati ili degradirati proteine. Stoga, je danas već ispitan i primijenjen velik broj različitih postupaka za izolaciju proteina iz biljnih izvora.

U tablici 2 prikazan je popis znanstvenih istraživanja na temu izolacije proteina iz biljnih sirovina koje se sve češće upotrebljavaju kao izvori proteina. Za svaku sirovinu je dana metoda izolacije proteina, prinos te svojstva koja su dodatno ispitivana.

**Tablica 2.** Pregled istraživanja izolacije proteina iz biljnih izvora

Sirovina	Tehnika ekstrakcije	Prinos proteina	Karakteristična funkcionalna svojstva	Referenca
<b>Mak</b>	hidroliza 1M NaOH, pH 9, 0; 1h sobna temperatura,	prinos pojedinih aminokiselina razina proteina (N x 6,25): 10,3	nisu ispitivana	Eklund i Ågren, 1974
<b>Mak</b>	5%-tni SDS i neionski detergent NP-40	0,4 ~6,6 mg proteina/mL	karakteristična za pojedine peptide	Nessler i sur., 1985
<b>Konoplja</b>	hidroliza 2M NaOH, pH 10,0	brašno: 50,2 % izolat proteina: 86,9 %	toplјivost, emulzifikacija, kapacitet vezanja vode i ulja	Tang i sur., 2006
<b>Konoplja</b>	hidroliza 1M NaOH, pH 10,0, sobna temperatura	HPI: $90.53 \pm 0.71$ % HPI-7S: $87.67 \pm 0.28$ % HPI-11S: $93.02 \pm 0.38$ % HPI=hemp protein isolate	probavljivost	Wang i sur., 2007
<b>Soja</b>	hidroliza 2M NaOH, pH 8,5	brašno: 43,3 % izolat proteina: 89,0%	toplјivost, emulzifikacija, kapacitet vezanja vode i ulja	Tang i sur., 2006
<b>Soja</b>	hidroliza 50%-tni NaOH	brašno: $54.20 \pm 0.15$ % hidrolizat soje i kukuruza 04: $94.24 \pm 1.61$ % koncentrat soje i kukuruza 04: $71.69 \pm 1.11$ %	sposobnost vezanja vode i ulja, toplјivost, udio N, emulzifikacija, svojstva pjenjenja	Hernández i sur., 2015
<b>Grašak</b>	hidroliza 50%-tni NaOH	brašno: $20.78 \pm 0.35$ %	sposobnost vezanja vode i ulja, toplјivost, udio N, emulzifikacija, svojstva pjenjenja	Hernández i sur., 2015

<b>Grašak</b>	hidroliza 1M NaOH, pH 8,5	nema podatka	topljivost, emulzifikacija, kapacitet i stabilnost pjene, apsorpcija vode	Jhonson i Brekke, 1983
<b>Uljana repica</b>	hidroliza 0,1M NaOH, pH 12,0 1h sobna temperatura 1h enzimi: alkalaza, kimotripsin, tripsin, pepsin i pankreatin	76,20%	proučavana antioksidativna svojstva	Alashi i sur., 2013
<b>Uljana repica</b>	PMM (protein micellar mass) 0,1M NaCl/0,1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 5,5	78,50%	termička stabilnost	Imond i Welsh, 1991
<b>Kakaova ljuska</b>	nije navedeno	16,07%	nisu ispitivana	Knapp i Churchman, 1937
<b>Slanutak</b>	hidroliza 0,2%- tni NaOH, pH 12, miješanje 1h	brašno: 24.7 $\pm$ 1.7 % izolat A: 78.0 $\pm$ 2.1 % izolat B: 88.1 $\pm$ 2.7%	probavljivost, topljivost, kapacitet vezanja vode i ulja, emulzifikacija	Sanchez- Vioque i sur., 1999
<b>Suncokret</b>	DE(Diffusion extracted) 1. ekstrakcija Skelly F, 45°C 2. HCl, do pH 5,5 pri 60, 80 i 90°C na 4, 1.5 i 1h	koncentrati proteina: brašno 55,5% DE 60°C:67,9% DE 80°C :68,3% DE 90°C :68,0% izolat proteina: DE 60°C: 90,7%	topljivost emulzifikacija svojstva pjenjenj sposobnost vezanja vode i ulja	Lin, Humberti i Sosulski, 1974
<b>Morske alge</b>	strogi alkalni uvjeti	smeđe alge: 3-15% zelene i crvene alge: 14-47%	probavljivost	Fleurence, 1999
<b>Bob</b>	hidroliza 1N NaOH, pH 9,5 40 min miješanje na sobnoj temperaturi	nema podatka	teksturalna svojstva i svojstva gela, stabilnos emulzije, stabilnos i kapacitet stvaranja pjene,	Makri i sur., 2005
<b>Heljda</b>	enzimska hidroliza pepsinom	amino grupe	probavljivost	Ikeda i Kishida, 1993
<b>Heljda</b>	nije navedeno	maksimalno: 15,4 % minimalno 12,6 %	nisu ispitivana	Pomeranz i Robbins, 1972

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1 Materijal

U ovom radu kao izvor proteina korištene su tri sirovine: mak (*Papaver somniferum* L.), industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) i kakaova ljuska (*Theobroma cacao* L.). Sve sirovine dobavljene su iz lokalnih prodavaonica (mak – Franck d.o.o., brašno konoplje – AROMAS d.o.o., kakaova ljuska – konditorska industrija Kandit d.o.o.) te su usitnjene u mlinu za domaćinstvo na prosječnu veličinu čestica (ujednačenu frakcioniranjem na granulometrijskim sitima) od 200-450  $\mu\text{m}$ .

##### 3.1.1. Kemikalije

*Određivanje osnovnog kemijskog sastava*

- 1) n-heksan (J. T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- 2) Sumporna kiselina (96 %-tna), Carlo Erba Reagents (Barcelona, Španjolska)
- 3) Borna kiselina, Carlo Erba Reagents, (Barcelona, Španjolska)
- 4) Klorovodična kiselina, Kemika (Hrvatska)
- 5) Etanol (96%-tni), Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

*Izolacija proteina*

- 1) Klorovodična kiselina, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 2) Natrijeva lužina, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

*Ispitivanje funkcionalnih svojstava proteina*

- 1) Folin-Ciocalteu reagens, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 2) Natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 3) Modra galica ( $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- 4) Kalij-natrij tartarat (K,Na-tartarata) Kemika (Zagreb, Hrvatska)

##### 3.1.2. Aparatura i pribor

Kod svih metoda korišten je stakleni (čaše, menzure, odmjerne tikvice, pipete, lijevak, Erlenmeyerove tikvice, odsisna boca, hladilo, eksikator, Duran boce, kapaljka) i plastični pribor (falcon epruvete, posudice) volumena 0-500 mL. Od metalnog pribora korištene su

pincete, tronožac, azbestna mrežica, a od ostalog pribora stalak za epruvete, propipete te četke za čišćenje. Za dodavanje malih i preciznih volumena korištene su automatske mikropipete od 20-1000  $\mu$ L.

- 1) Analitička vaga, Mettler-Toledo (Švicarska)
- 2) Laboratorijski sušionik (Tehtnica Železniki, Slovenija)
- 1) Aparatura po Soxhletu INKO SK6 SS (Poljska)
- 2) Celulozne čahure za ekstrakciju
- 3) Rotacijski vakuum uparivač (R-205) s pripadajućom vodenom kupelji (B-490), Büchi New Castle, DE, SAD)
- 4) Kjeldahl kivete za digestiju (500 mL), FOSS, (Haganäs, Sweden)
- 5) Poluautomatska aparatura za određivanje dušika prema Kjeldalu, Kjeltec TM 2100, FOSS (Haganäs, Sweden)
- 6) Termoblok za digestiju uzoraka s odgovarajućim nastavkom za odsis para, Digestion system 6, 1007 Digester, Tecator (Hillerød, Danska)
- 7) Mufolna pec tip Heraeus KR-170, W.C. Heraeus gmbh (Hanau, Njemačka)
- 8) Magnetska miješalica RT 5 power IKAMAG (Njemačka)
- 9) pH-metar 744 Metrohm (Metrohm, AG; Zofingen, Švicarska)
- 10) Vodena kupelj, (B- 490, Mew Castle, SAD)
- 11) Spektrofotometar, Genesys 10s UV-Vis, Thermo scientific (SAD)
- 12) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 13) Ultraturax, IKA-T18 basic (Njemačka)
- 14) Konduktometar Cond-330i, WTW (Njemačka)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Karakterizacija osnovnog kemijskog sastava sirovina

U svrhu karakterizacije osnovnog kemijskog (nutritivnog) sastava ispitivanih sirovina, primijenjene su standardne analitičke metode, kako slijedi:

- ***Određivanje udjela suhe tvari (vode):*** određivanjem udjela suhe tvari sušenjem do konstantne mase na 105°C (prema modificiranoj AOAC 930.15 (1990b) metodi)



- **Određivanje udjela masti:** višekratnom kontinuiranom ekstrakcijom masti organskim otapalom u aparaturi po Soxhlet-u (prema modificiranoj AOAC 963.15 (2012) metodi)
- **Određivanje udjela proteina:** poluautomatskom metodom po Kjeldahlu (prema AOAC 920.152 (1995) metodi)
- **Određivanje udjela mineralnog ostatka (pepela):** gravimetrijski, suhom mineralizacijom uzorka na 550°C (prema AOAC 950.49 (1997) metodi).

Udjel ugljikohidratne frakcije izračunat je kao razlika ukupnog zbroja udjela svih prethodno određenih komponenata od 100%.

### 3.2.2. Frakcijska izolacija proteina

Kako bi se razvio optimalan postupak izdvajanja proteina, koji omogućuje maksimalan prinos proteinske frakcije, primijenjen je postupak izdvajanja proteina alkalnom hidrolizom na dvije različite temperature te precipitacijom pri izoelektičnoj točki proteina. Postupku izdvajanja proteina prethodili su postupci uklanjanja masti iz sirovina (odmaščivanja), uklanjanja ekstraktibilnih tvari te je ispitan i utjecaj prethodnog uklanjanja ugljikohidratne frakcije. Postupak izdvajanja proteina primijenjen u ovom istraživanju proveden je prema shematskom prikazu kako slijedi:



**Slika 2.** Shematski prikaz postupka izdvajanja proteina iz ispitivanih sirovina

### **Odmašćivanje uzoraka**

Odmašćivanje uzorka u ovom radu provedeno je prema postupku opisanom u istraživanju Belščak-Cvitanović i sur. (2009), s *n*-heksanom kao otapalom. Određena količina uzorka (5 g) odvagana je u staklene Duran boce (200 mL) te je nakon dodatka alikvota od 50 mL *n*-heksana uzorak miješan na magnetnoj miješalici 5 min na 750 rpm. Nakon miješanja supernatant je odvojen iz suspenzije centrifugiranjem te odbačen, dok je krutom ostatku dodano novih 50 mL otapala i cijeli postupak je ponovljen još dva puta. Nakon odmašćivanja kruti talog je ostavljen preko noći kako bi se potpuno othlapilo organsko otapalo.

### **Uklanjanje ekstraktibilnih tvari**

S obzirom da slobodne, ekstraktibilne tvari u uzorcima podrazumijevaju slobodne šećere, bioaktivne tvari te pigmente, koji su uglavnom polarne prirode, uklanjanje ovih tvari provedeno je trostrukom ekstrakcijom s vodenom otopinom etanola (70%). U staklenu čašu odvagano je 10 g odmašćenog uzorka, te je dodano 100 mL 70%-tnog etanola, nakon čega se sadržaj čaše miješa tijekom 30 minuta na magnetskoj miješalici (na sobnoj temperaturi). Nakon završetka miješanja dobiveni ekstrakt se profiltrira kroz vakuum sisaljku, koristeći Whatman br. 1 filter papir. Kruti ostatak (talog) pažljivo se prebaci natrag u čašu kako bi se izbjegli kvantitativni gubici materijala, te se postupak ekstrakcije provede još 2 puta uz novu porciju otapala. Filtrat se odbacuje, dok se kruti talog zaostao nakon treće ekstrakcije suši na 40°C kako bi se uklonio višak otapala, sakuplja i koristi za daljnji postupak izolacije proteina.

### **Izolacija proteina**

Izolacija proteina provedena je prema postupku opisanom u istraživanju ( Stone i sur.,2014) alkalnom hidrolizom uzoraka te naknadnom precipitacijom pri izoelektričnoj točki pri dvije različite temperature (sobna – 23°C i 75°C).

#### **Postupak rada:**

Za hidrolizu i precipitaciju proteina korištene su 1M otopina natrijeve lužine i 1M otopina klorovodične kiseline. Za provođenje hidrolize, u tamne staklene bočice odvagano je 10 g uzorka te je dodano 100 mL destilirane vode, nakon čega se na pH metru podese pH takve otopine dodavanjem 1M natrijeve lužine, dok se ne dosegne pH vrijednost od 9,5. Začepljeni

uzorci zatim se u slučaju hidrolize na sobnoj temperaturi miješaju na magnetskoj miješalici tijekom 60 min, ili u slučaju hidrolize na 75°C u vodenoj kupelji na odgovarajućoj temperaturi. Nakon ekstrakcije, uzorci se brzo ohlade u ledenoj kupelji kako bi se spriječila daljnja hidroliza te se sadržaj bočica centrifugira na 10 000 rpm, kroz 10 min. Talog zaostao nakon hidrolize ispere se malom količinom vode i ponovno centrifugira, te se supernatanti spoje i precipitiraju proteini dodatkom 1M otopine klorovodične kiseline do postizanja pH=4,5 (na pH metru). Precipitacija proteina pospješuje se hlađenjem otopine na 4°C kroz 2h uhladnjaku nakon čega se dobiveni precipitat ovajom precipitacijom i liofilizira kako bi se odredio prinos proteina. Dobivenim proteinskim frakcijama određen je udjel proteina, primjenom prethodno navedene poluautomatske metode po Kjeldahlu.

Kako bi se ispitala mogućnost povećanja prinosa proteina prilikom izdvajanja proteina iz ispitivanih sirovina, provedena je i kiselinska hidroliza odmašćenih uzoraka prije same izolacije proteina. U tu svrhu odmašćeni uzorak hidroliziran je pomoću klorovodične kiseline na pH=1,5 kroz sat vremena na 75°C, nakon čega je talog odvojen od supernatanta te korišten za izolaciju proteina alkalnom hidrolizom na 75°C kako je prethodno opisano. Budući da ovakav način nije dao zadovoljavajući prinos proteina zbog neselektivnosti i prevelikih kvantitativnih gubitaka, iznimno mali prinos proteina dobiven na ovaj način nije bio dostatan za karakterizaciju svojstava ovih izolata.

### **3.3 Karakterizacija funkcionalnih svojstava izdvojenih proteinskih frakcija**

#### ***3.3.1. Ispitivanje topljivosti proteina***

Topljivost proteina određena je u otopinama izoliranih proteina koncentracije ( 0,5%-tna otopina), metodom po Lowryju, pri različitim pH vrijednostima otopina. pH otopina proteina (pH = 3, 5, 7, 9) podešen je primjenom 1 M otopina natrijeve lužine i klorovodične kiseline.

#### **Postupak rada:**

Za provođenje mjerenja, otopine proteina pri različitim pH vrijednostima centrifugirane su na 3500 rpm kroz 5 minuta te je dobiven bistri supernatant razrijeđen i korišten za određivanje udjela proteina spektrofotometrijskom metodom po Lowryu.

U staklenu epruvetu se doda 2 mL reagensa C i 400 µL uzorka, pomiješa te se sadržaj ostavi 15 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim se doda 200 µL Folin-Ciocalteu reagensa, homogenizira te se nakon 45 minuta mjeri apsorbancija uzorka pri 750 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba umjesto uzorka sadrži jednaki volumen vode. Udjel proteina određuje se primjenom jednadžbe baždarnog pravca za goveđi serum albumin (jednadžba

bazdarne). Topljivost proteina izražava se kao relativni omjer određenog udjela proteina i koncentracije otopine pri pojedinom pH.

### ***3.3.2. Kapacitet i stabilnost pjenjenja***

#### Postupak rada:

U staklenu čašu, odvaži se 0,15 g uzorka te se pipetom doda 15 mL vode. Sadržaj u čaši se miješa na magnetskoj miješalici do potpunog otapanja te se podesi pH otopine natrijevom lužinom na 7. Tako pripremljen uzorak miješa se na ultraturax IKA-T18 basic uređaju na brzini 4 u periodu od 3 minute. Iz volumena uzorka prije miješanja te volumena nastale pjene neposredno nakon miješanja te nakon 30 minuta, izračuna se kapacitet pjenjenja pomoću jednadžbe Liu i sur. (2010):

$$FC(\%) = ((V_0 + V_1) / V_1) * 100$$

gdje su:

FC-kapacitet pjenjenja

$V_0$ -volumen vode dodane uzorku

$V_1$ -volumen pjene u 0'

Stabilnost pjenjenja se računa pomoću jednadžbe

$$FS(\%) = ((V_0 + V_2) / V_0) * 100$$

gdje su:

FS-stabilnost pjenjenja

$V_0$ -volumen vode dodane uzorku

$V_2$ -volumen pjene u 30'

### ***3.3.3. Električna provodljivost***

#### Postupak rada:

Otopinama prethodno pripremljenim za određivanje sposobnosti pjenjenja podešena je pH vrijednost na 7,0 (1M natrijevom lužinom) te se izmjerila vrijednost električne provodljivosti (konduktivnosti) primjenom konduktometra (Cond-330i, WTW) na sobnoj temperaturi. Mjerenje je provedeno uranjanjem elektrode u otopine uzoraka. Na ekranu uređaja se nakon nekoliko sekundi očita vrijednost provodnosti i zapiše.

### **3.3.4. Kapacitet vezanja vode i ulja**

#### Postupak rada:

U plastičnu epruvetu odvagano je 0,05 g uzorka te je dodano 5 mL destilirane vode i otopina je homogenizirana na vortex mikseru 1 minutu. Nakon toga uzorak se ostavi 3 sata na sobnoj temperaturi i centrifugira na 3000 rpm kroz 5 minuta, nakon čega se očita volumen supernatanta. Za određivanje kapaciteta vezanja ulja, ponavlja se prethodno opisan postupak određivanja kapaciteta vezanja vode, ali se umjesto 5 mL vode uzorku dodaje ekvivalentan volumen ulja. Kapacitet vezanja vode (WHC) ili ulja (FAC) izračuna se primjenom jednadžbe ( Stone i sur.,2014):

$$\text{WHC/FAC} = ((V_0 - V_v) / V_0) / m$$

gdje su:

WHC/FAC-kapacitete vezanja vode/ulja (mL/g)

$V_0$ -volumen vode/ulja dodane uzorku (mL)

$V_v$  -volumen supernatanta (mL)

m-masa uzorka (g)

### **3.3.5. Indeks aktivnosti emulzifikacije (EAI) i indeks razdvajanja emulzije (ESI)**

Kapacitet i stabilnost emulzije se određuju mjerenjem apsorbancije uzoraka pri različitim pH vrijednostima prema modificiranoj metodi Qi i suradnika (1997).

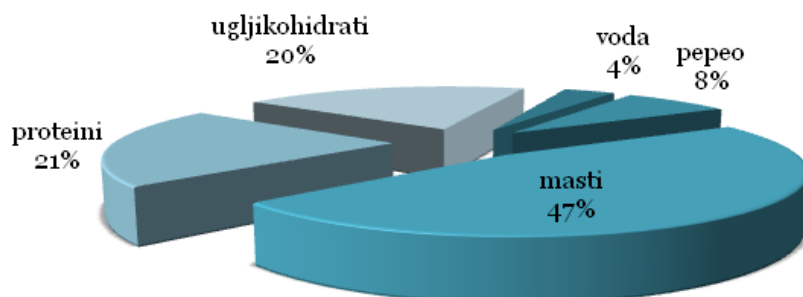
#### Postupak rada:

U staklenu epruvetu doda se 2,4 mL 0,5%-tne otopine uzorka koji je prethodno pripremljen za određivanje sposobnosti pjenjenja, 3,6 mL destilirane vode i 2,0 mL suncokretova ulja. Uzorci se potom homogeniziraju na vortex mikseru 1 minutu nakon čega se odmah mjeri apsorbancija pri 500 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba umjesto uzorka sadrži jednaki volumen vode. Apsorbancija se mjeri u nultoj minuti te nakon 10 minuta. Na temelju izmjerenih vrijednosti apsorbancija izračunaju se indeks aktivnosti emulzifikacije (EAI) i razdvajanja emulzije (ESI) .

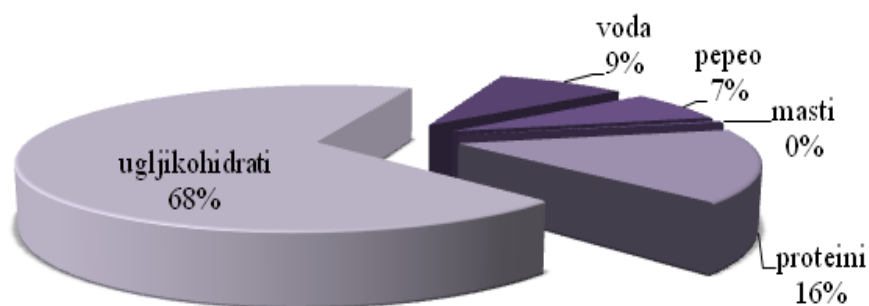
## 4. REZULTATI

U ovome su radu ispitivana funkcionalna svojstva proteina iz maka, kakaove ljuske i konoplje. Primjenom standardnih analitičkih metoda određen je osnovni kemijski sastav sirovina koji je prikazan na slikama 3-5 (mak – slika 3; kakaova ljuska – slika 4; konoplja – slika 5). Izolacija proteina provedena je alkalnom hidrolizom uzoraka pri dvije različite temperature (sobna temperatura i 75°C) te naknadnom precipitacijom pri izoelektričnoj točki. Dobiveni prinos proteina pri različitim postupcima izolacije iz ovih sirovina prikazan je na slici 6. Udjel proteina u izdvojenim proteinskim frakcijama određen metodom po Kjeldahlu prikazan je na slici 7. Proteinskim frakcijama izoliranim pri različitim temperaturama (sobna i 75°C) u ovisnosti o pH vrijednosti otopina tih frakcija ispitana su karakteristična fizikalno-kemijska svojstva. prikazana na slikama 9-13 Topljivost proteina prikazana je na slici 8, kapacitet i stabilnost pjenjenja na slici 9, električna provodljivost na slici 10, kapacitet vezanja vode i ulja na slici 11. Osim toga ispitana su i svojstva indeksa aktivnosti emulzifikacije i indeksa razdvajanja emulzije te su prikazani na slici 13).

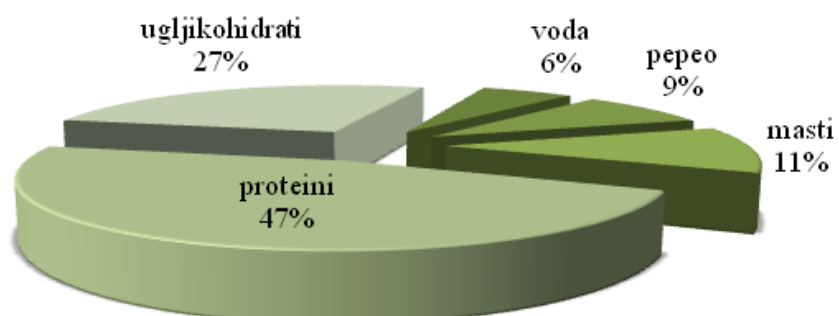
#### 4.1 Osnovni kemijski sastav sirovina



Slika 3. Osnovni kemijski sastav maka

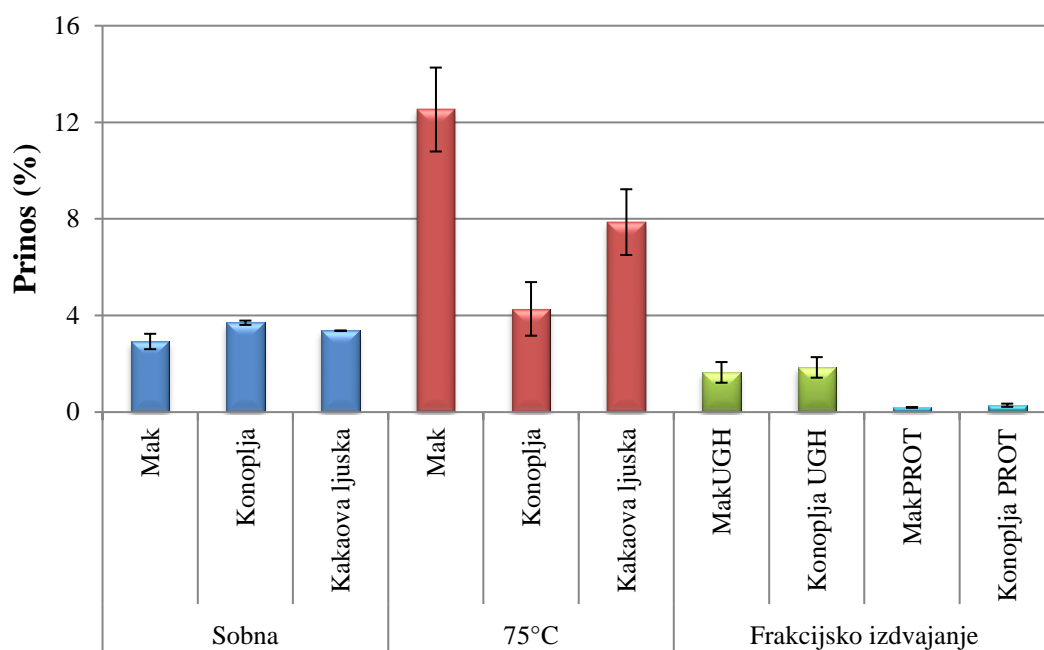


Slika 4. Osnovni kemijski sastav kakaove ljsuke

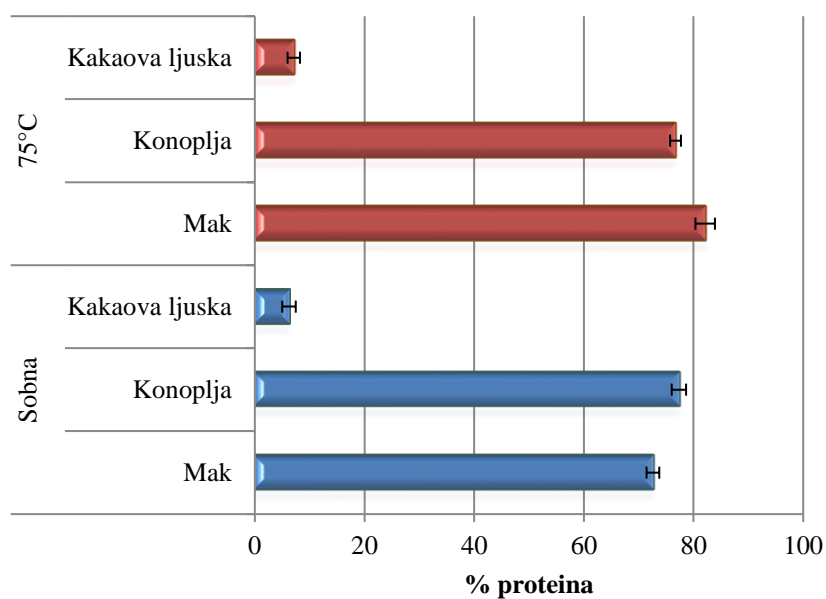


Slika 5. Osnovni kemijski sastav konoplje

#### 4.2. Prinos i udio izoliranih proteinskih frakcija iz ispitivanih sirovina



Slika 6. Prinosi proteina pri različitim postupcima ekstrakcije odmašćenih sirovina

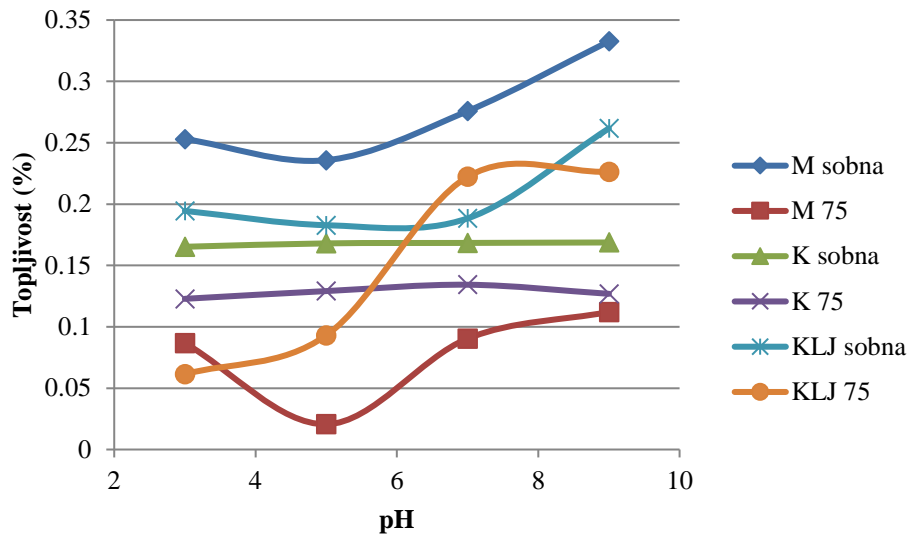


Slika 7. Udjel proteina u izdvojenim proteinskim frakcijama određen po Kjeldahlu



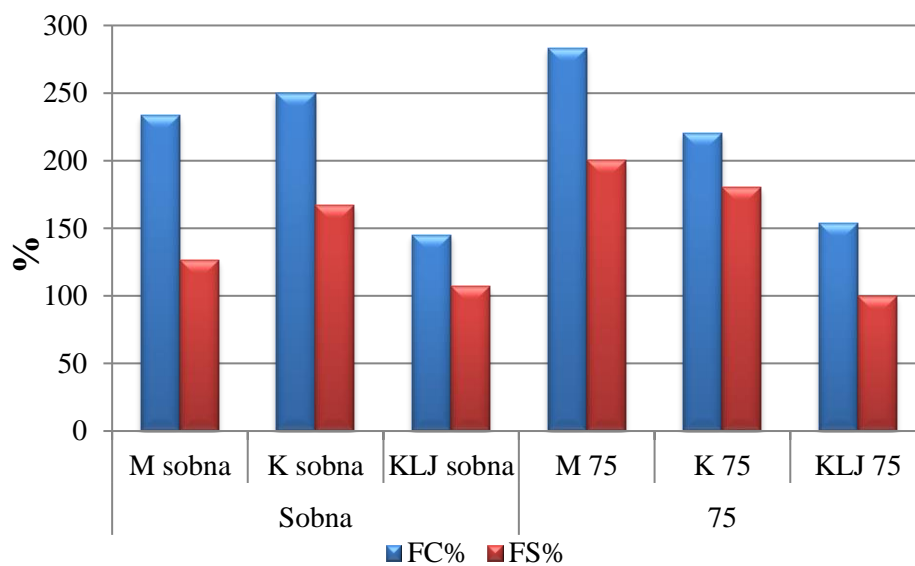
### 4.3 Fizikalno-kemijska svojstva proteina

#### 4.3.1 Topljivost proteina



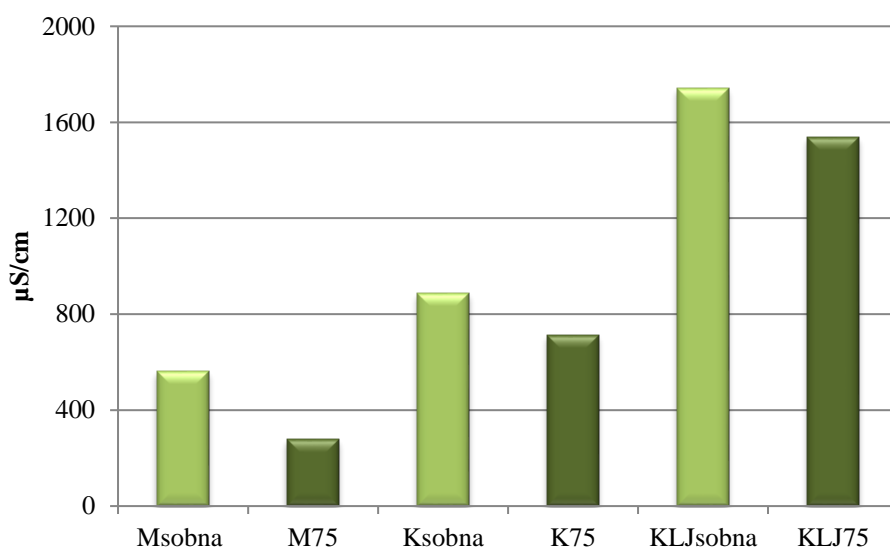
**Slika 8.** Topljivost proteina odmašćenih sirovina (mak, konoplja, kakaova ljuska) pri različitim temperaturama ekstrakcije

#### 4.3.2. Kapacitet i stabilnost pjenjenja



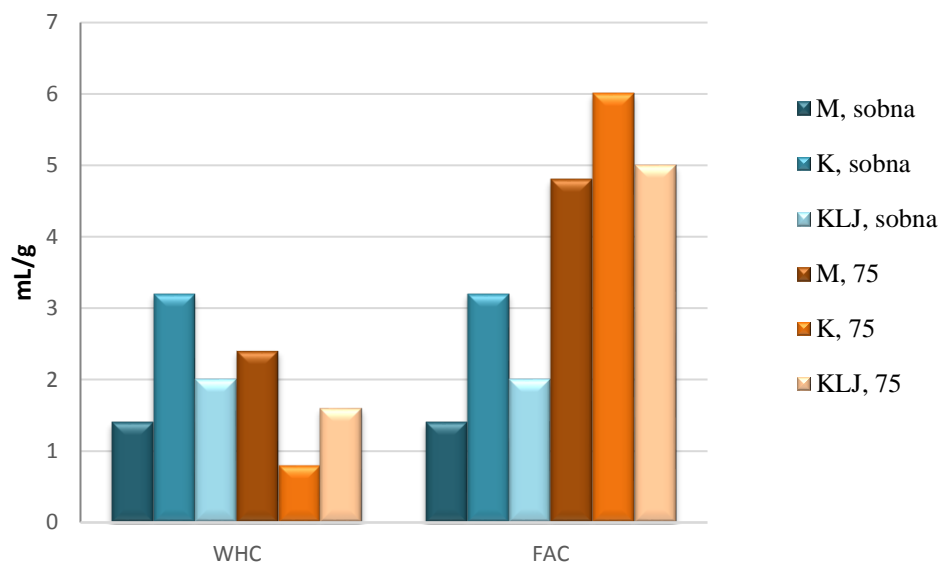
**Slika 9** Kapacitet pjenjenja (FC) i stabilnost pjenjenja (FS) odmašćenih sirovina (mak, konoplja, kakaova ljuska)

### 4.3.3. Električna provodljivost



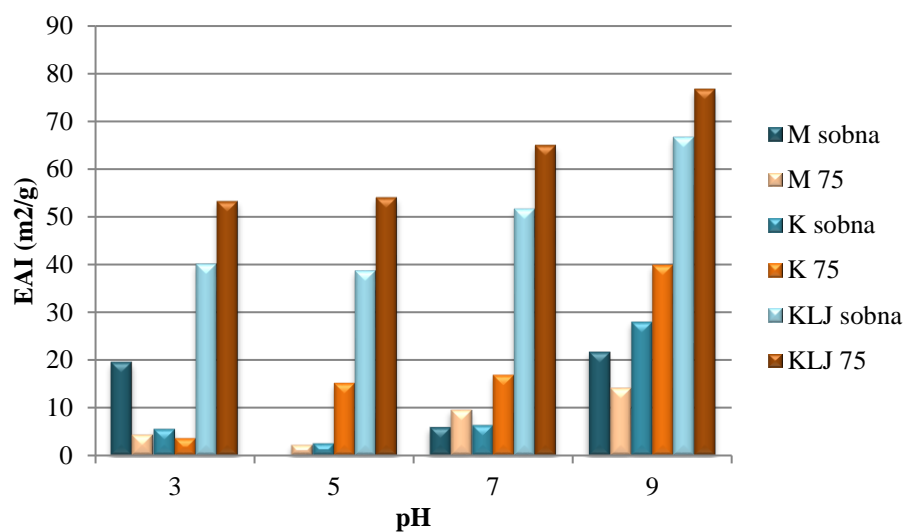
Slika 10. Vodljivost proteina odmašćenih sirovina (mak, konoplja, kakaova ljuska)

### 4.3.4. Kapacitet vezanja vode i ulja

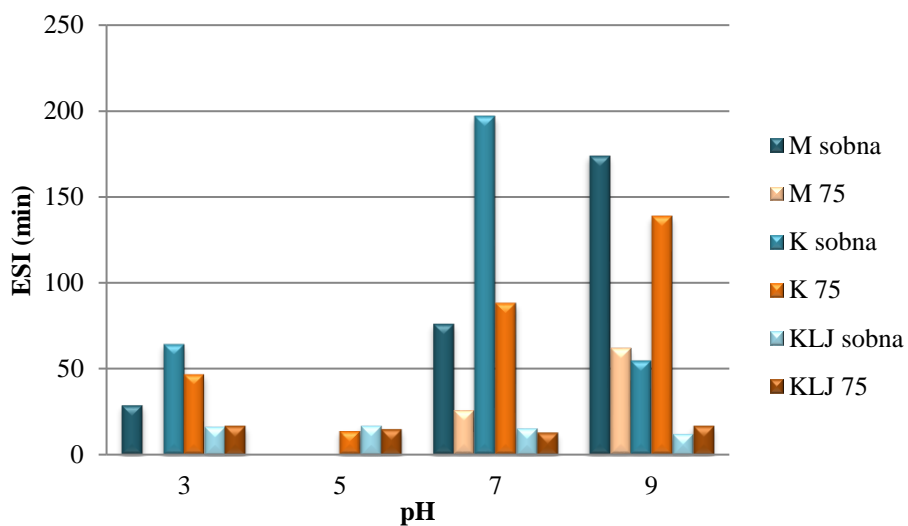


Slika 11. Kapacitet vezanja vode (WHC) i ulja (FAC)

### 4.3.5. Emulzifikacija proteina



**Slika 12.** Indeks aktivnosti emulzifikacije (EAI) proteina odmašćenih sirovina (mak, konoplja, kakaova ljuska) u ovisnosti o pH otopine



**Slika 13.** Indeks razdvajanja emulzije (ESI) proteina odmašćenih sirovina (mak, konoplja, kakaova ljuska) u ovisnosti o pH otopine

## **5. RASPRAVA**

### **5.1. Osnovni kemijski sastav sirovina**

Osnovni kemijski sastav sirovina ispitivanih kao izvori proteina u ovom radu određen je primjenom standardnih analitičkih metoda te je prikazan na slikama 1-3. Prema raspodjeli glavnih nutrijenata, vidljivo je da mak sadrži najveći udjel masti (47%), kakaova ljuska ugljikohidrata (68%), dok je konoplja iznimno dobar izvor proteina (47%). Prema tim rezultatima, usporedbom svih triju sirovina vidljivo je da je konoplja najbogatiji izvor proteina, nakon čega slijede mak (21%) te kakaova ljuska sa samo 16% proteina. Međutim, u ovom istraživanju kao jedna od potencijalnih izvora ispitivana je i kakaova ljuska, bez obzira na konačan manji prinos proteina, što se može kompenzirati potencijalno povoljnim funkcionalnim svojstvima izolirane frakcije. Rezultati određivanja udjela osnovnog kemijskog sastava ovih sirovina u skladu su s literaturnim podacima, premda se veće razlike u nekim istraživanjima mogu objasniti razlikama u porijeklu i sastavu sirovine te primijenjenih metoda analize i karakterizacije. Tako su Yilmaz i Emir (2016) u svome istraživanju odredili udio proteina u maku od 44%, dok je prema rezultatima Tanga i suradnika (2006) udio proteina u konoplji iznosio 50,2 % što je u skladu s vrijednostima ovoga rada.

### **5.2. Prinos i udio proteina**

Na slici 4 prikazan je prinos proteina pri različitim postupcima ekstrakcije odmašćenih sirovina te prinos proteinske i ugljikohidratne frakcije dobivene pri postepenom frakcijskom izdvajanju istih odmašćenih uzoraka. Prinos proteina ekstrahiranih pri sobnoj temperaturi bio je najveći za konoplju (~3,70 %), dok je za kakaovu ljusku (~3,37 %) i mak (~2,92 %) bio nešto manji. Postupak izolacije pri 75°C rezultirao je najboljim prinosom za sve tri sirovine. Najveći prinos tako je dobiven izolacijom proteina iz maka (~12,53 %), potom iz kakaove ljuske (~7,87 %) dok je najmanji prinos dobiven izolacijom proteina iz konoplje (~4,27 %). Kao što je već prethodno navedeno, postepeno izdvajanje prvo ugljikohidratne, a zatim proteinske frakcije, primjenom kiselinske pa zatim alkalne hidrolize nije rezultiralo zadovoljavajućim prinosom, stoga izolati dobiveni na ovaj način nisu primjenjivani za daljnju karakterizaciju. Prinos proteina i ugljikohidrata pri frakcijskom izdvajanju istih odmašćenih sirovina bio je značajno manji u usporedbi sa drugim metodama. S obzirom na činjenicu da je prinos proteina važan faktor u odabiru postupka izolacije, prema ovom kriteriju izolacija pri

povišenim temperaturama bila bi preporučena za maksimiziranje prinosa proteina. S obzirom da su primijenjeni postupci alkalne izolacije proteina, iznimno neselektivni te osim proteina mogu rezultirati i izdvajanjem drugih spojeva sličnih svojstava i polarnosti, u proteinskim frakcijama izdvojenim pri različitim temperaturama ekstrakcije određen je udjel proteina polu-automatskom metodom po Kjeldahlu. Prema dobivenim rezultatima, vidljivo je da u dobivenim proteinskim frakcijama udjel proteina iznosi od 6% do 82%. U proteinskim frakcijama dobivenima izolacijom pri sobnoj temperaturi najveći udio proteina zabilježen je kod konoplje (77,33 %), nešto manji kod maka (72,59 %), a najmanji kod kakaove ljuske (6,23 %). Postupkom izolacije pri 75°C najveći udio proteina određen je u proteinskoj frakciji maka (82,12 %), potom konoplje (76,71 %), a najmanji iz kakaove ljuske (7,1 %). Na temelju tih rezultata vidljivo je da bez obzira na visok prinos frakcije izolirane iz kakaove ljuske tu frakciju ne čine proteini, već ugljikohidratne tvari, što je su skladu s činjenicom da je kakaova ljuska primarno izgrađena od polisaharidnih, posebice pektinskih tvari.

### **5.3 Fizikalno-kemijska svojstva proteina**

#### **5.3.1. Topljivost proteina**

Topljivost proteina mjerena je u odnosu na različite temperature izolacije te pri različitim pH vrijednostima. Na slici 6 vidljivo je da se porastom pH vrijednosti topljivost proteina povećava, te da je općenito veća za sve proteinske frakcije izolirane pri sobnoj temperaturi. Najveća topljivost proteina pri sobnoj temperaturi, ali i svih pH vrijednosti određena je u proteinskoj frakciji maka (~0,25-0,33 %). Istraživanje Ylmaza i Emira (2016) navodi kako je topljivost proteina maka pri sobnoj temperaturi najmanja oko njihove izoelektrične točke (pI 5,0), te da iznad te vrijednosti raste. Ova tvrdnja u skladu je s rezultatima ovoga rada. Najmanju topljivost pri sobnoj temperaturi pokazali su proteini konoplje, a njihova topljivost je gotovo jednaka kod svih pH vrijednosti (~ 0,17 %). Topljivost proteina konoplje izoliranih u istraživanju Tanga i suradnika (2006) bila je najmanja pri pH 4,0-6,0. Pri pH 7,0 topljivost je bila oko 38%, a iznad pH 8,0 je bila veća od 90%. Značajna razlika u rezultatima se može pripisati drugačijem postupku ekstrakcije proteina te posljedično različitom funkcionalnošću i fizikalno-kemijskim svojstvima proteina. Pri 75°C topljivost proteina je pri početnom pH najveća kod konoplje (~0,12 %), a najmanja kod kakaove ljuske (~0,06 %). Porastom pH vrijednosti, topljivost proteina kakaove ljuske značajno raste te je pri najvišoj pH vrijednosti njihova topljivost najveća (~0,23 %), a pri istoj pH vrijednosti proteina maka najmanja (~0,11

%). Kao i pri sobnoj temperaturi topljivost proteina konoplje pri 75°, pri različitim pH vrijednostima se nije značajno mijenjala (~0,13 %).

### **5.3.2. Svojstva pjenjenja izoliranih proteinskih frakcija**

#### **5.3.2.1 Stabilnost pjenjenja(FS)**

Slika 9 prikazuje stabilnost pjenjenja pri različitim temperaturama ekstrakcije. Pri sobnoj temperaturi FS je najveća kod izolata proteina konoplje (166,67 %), potom za mak (126,67 %), a najmanja za kakaovu ljusku (106,67 %). FS u istraživanju Yilmaza i Elmira (2016) pri sobnoj temperaturi je iznosila samo oko 21,87 %, što se može pripisati razlikama u primijenjenoj metodi analize, ali i samim svojstvima izoliranih spojeva. Pri 75°C FS je najveća za proteinsku frakciju maka (200 %), zatim konoplje (180 %) te najmanja za kakaovu ljusku (100 %). Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da je stabilnost pjenjenja bolja kod ekstrakcije pri 75°C za sve sirovine, osim kod kakaove ljuske.

#### **5.3.2.2. Kapacitet pjenjenja (FC)**

Kapacitet pjenjenja je također prikazan na slici 9 i pri različitim temperaturama ekstrakcije. Pri sobnoj temperaturi najveći FC ima proteinska frakcija konoplje (250 %), potom maka (233,33 %) te kakaove ljuske (145 %). U istraživanju Yilmaza i Elmira (2016) FC za mak pri sobnoj temperaturi iznosio je oko 19,26 %. Najbolji FC pri 75°C ima proteinska frakcija maka (283,33 %), zatim konoplje (220 %), a najmanji kakaove ljuske (153,33 %). Kapacitet pjenjenja je za sve sirovine veći pri 75°C, a za konoplju pri sobnoj temperaturi.

### **5.3.3. Električna provodljivost**

Slika 10 prikazuje vodljivost otopina izoliranih proteinskih frakcija pri različitim temperaturama ekstrakcije. U slučaju izolata dobivenih pri sobnoj temperaturi, najveću vodljivost pokazala je proteinska frakcija kakaove ljuske (1741  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), potom konoplje (887  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), a najmanju maka (560  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). Pri 75°C najveću vodljivost ponovno je imala proteinska frakcija kakaove ljuske (1536  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), potom konoplje (712  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), a najmanju također maka (277  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ).

#### **5.3.4. Kapacitet vezanja vode (WHC) i ulja (FAC)**

Slika 11 prikazuje kapacitet vezanja vode izdvojenih proteinskih frakcija pri različitim temperaturama ekstrakcije. WHC je za sve sirovine bolji kod proteinskih frakcija izdvojenih pri 75°C nego na sobnoj temperaturi, međutim bez značajnih razlika između pojedinih izolata s obzirom na primijenjene temperature ekstrakcije. Pri 75°C najbolji WHC pokazala je proteinska frakcija maka (0,16 mL/g), potom konoplje (0,12 mL/g), a najmanji kakaove ljske (0,08 mL/g). Najbolji WHC pri sobnoj temperaturi pokazala je proteinska frakcija konoplje (0,1 mL/g), potom maka (0,07 mL/g) te ponovno najmanji kakaove ljske (0,04 mL/g). Kapacitet vezanja ulja pri različitim temperaturama ekstrakcije prikazan je na slici 12. Pri temperaturi od 75°C najbolji FAC pokazala je proteinska frakcija kakaove ljske (0,25 mL/g), potom konoplje (0,24 mL/g), a najmanju maka (0,16 mL/g). Pri sobnoj temperaturi najbolju vrijednost ponovno je pokazala proteinska frakcija kakaove ljske (0,3 mL/g), potom konoplje (0,1 mL/g), a najmanju maka (0,07 mL/g). S obzirom na konačnu primjenu, svojstva vezanja vode i ulja iznimno su bitna u prehrambenoj industriji. Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu može se zaključiti kako je izolacijom na 75°C preferirano dobivanje proteina s boljim svojstvima vezanja vode i ulja u odnosu na sobnu temperaturu. Također, iznimno visok kapacitet vezanja ulja izdvojene frakcije kakaove ljske izdvaja ovaj sastojaka kao potencijalno dobar za primjenu u proizvodnji emulzija i pjena.

#### **5.3.5. Emulzifikacija**

##### **5.3.5.1. Indeks aktivnosti emulzifikacije (EAI)**

Indeks aktivnosti emulzifikacije za sve sirovine pri različitim temperaturama izolacije na slici 7 prikazuje ovisnosti o pH vrijednosti. Porastom pH vrijednosti raste i EAI-a kod svih sirovina. U slučaju proteinske frakcije maka pri obje temperature i konoplje pri sobnoj temperaturi zabilježen je pad EAI-a pri pH 5, ali je kasnije porastom pH ponovno došlo do porasta vrijednosti EAI-a. Sličan rezultat zabilježen je u istraživanju Tanga i suradnika (2006) gdje pri pH 4 dolazi do pada, a kasnije ponovno do rasta EAI-a, ali je vrijednost bila puno veća (~16,0 m<sup>2</sup>/g) u odnosu na rezultate ovog rada. Pri sobnoj temperaturi najmanji EAI je zabilježen pri pH 5 za konoplju (2,5 m<sup>2</sup>/g), a najveći pri pH 9 za kakaovu ljsku (~66,70 5 m<sup>2</sup>/g). Kod ekstrakcije pri 75°C najmanja vrijednost EAI-a zabilježena je pri pH 5 za proteinsku frakciju maka (~2,18 5 m<sup>2</sup>/g), a najveća za kakaovu ljsku (~76,71 5 m<sup>2</sup>/g).

Ovakvi rezultati potvrdili su potencijalno dobra svojstva emulzifikacije u slučaju izolata kakaove ljuske, što ukazuje na potrebu za dodatnim ispitivanjima i karakterizacijom svojstava ove sirovine.

#### 5.3.5.2. Indeks razdvajanja emulzije (ESI)

Indeks razdvajanja emulzije prikazan je ovisnosti različitih pH vrijednosti pri različitim temperaturama na slici 8. U odnosu na EAI, porastom pH vrijednosti ne dolazi i do porasta ESI-a te je različit kod svake pH vrijednosti. Općenito se može primijetiti da je ESI veći pri frakcijama izdvojenima pri sobnoj temperaturi. Najmanji ESI pri sobnoj temperaturi je izmjeren pri pH 9 za proteinsku frakciju kakaove ljuske (~12,14 min), a najveći pri pH 7 za konoplju (~196,92 min). Pri 75°C najmanji ESI je izmjeren pri pH 7 za proteinsku frakciju kakaove ljuske (~12,40 min), a najveći pri pH 9 za konoplju (~138,79 min).



## 6. ZAKLJUČCI

1. Usporedba kemijskog sastava svih triju sirovina pokazala je da je konoplja najbogatiji izvor proteina, mak masti, a kakaova ljuska ugljikohidrata.
2. Prinos proteina i njihov udio u izdvojenim proteinskim frakcijama veći je pri provođenju postupka izolacije na 75°C.
3. Najveći prinos dobiven je izolacijom proteina iz maka (~12,53 %), potom iz kakaove ljuske (~7,87 %) dok je najmanji prinos dobiven izolacijom proteina iz konoplje (~4,27 %).
4. Topljivost proteina za proteinske frakcije izdvojene iz sve tri sirovine veća je pri sobnoj temperaturi, te se povećava porastom pH vrijednosti.
5. Sposobnost vezanja vode i ulja te stabilnost i kapacitet pjenjenja veći su za proteinske frakcije izdvojene pri 75°C.
6. Veći kapacitet i stabilnost pjene pokazale su proteinske frakcije izdvojene pri 75°C.
7. Porastom pH vrijednosti otopina izoliranih proteina, primijećeno je povećanje indeksa aktivnosti emulzifikacije.
8. Najveći indeks aktivnosti emulzifikacije pokazale su proteinske frakcije izolirane iz kakaove ljuske.
9. Povišenjem pH vrijednosti raste i indeks razdvajanja emulzije, posebice u slučaju proteinskih frakcija maka i konoplje.

## 7. LITERATURA

Cunniff, A. (1995) Official Methods of Analysis of AOAC International, 16. izd., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Eklund, A., Ågren, G. (1974) Nutritive Value of Poppy Seed Protein. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **54**, 188-190.

Fluerence, J. (1999) Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends Food Sci. Technol.* **10**, 25-28.

Ikeda, K., Kishida, M. (1993) Digestibility of proteins in buckwheat seed. *Fagopyrum* **13**, 21 – 24.

Ismond, M. A. H., Welsh, W. D. (1992) Application of new methodology to canola protein isolation. *Food Chem.* **45**, 125-127.

James, C. S. (1995) Analytical Chemistry of Foods. Blackie Academic & Professional, Glasgow, NZ str. 91-92.

Johnson, E. A., Bflekk, C. J. (1983) Functional properties of acylated pea protein isolates. *J. Food. Sci.* **48**, 722-725.

Kinsella, J. E. (1981) Functional properties of proteins: possible relationships between structure and function in foams. *Food Chem.* **7**, 273-288.

Kinsella, J. E., Melachouris, N. (1976) Functional properties of proteins in foods: A survey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* **73**, 219-280.

Knapp, A. W., Churchman A. (1937) Cacao shell and its use as an accessory fodder. *Chem. Ind.* 29-33.

Lin, M. J. Y., Humbert, E. S., Sosulski, F. W. (1974) certain functional properties of sunflower meal products. *J. Food Sci.* **39**, 368-370 .

Makri, E., Papalamprou, E., Doxastakis, G. (2005) Study of functional properties of seed storage proteins from indigenous European legume crops (lupin, pea, broad bean) in admixture with polysaccharides. *Food Hydrocoll.* **19**, 583–594.

Nessler, C.L., Allen, R.D., Galewsky, S. (1985) Identification and Characterization of latex-specific proteins in pium poppy. *Plant Physiol.* **79**, 499-504.

Pomeranz, Y., Robbins, G.S. (1971) Amino Acid Composition of Buckwheat. *J. Agric. Food Chem.* **20**, 270-274.

Pravilnik o žitaricama, mlinskim i pekarskim proizvodima, tjestenini, tijestu i proizvodima od tijesta (2005) Narodne novine **78**, Zagreb (NN 78/05).

Qi, M., Hettiarachchy, N. S., Kalapathy, U. (1997) Solubility and Emulsifying Properties of Soy Protein Isolates Modified by Pancreatin. *J. Food Sci.* **62**, 1110-1115.

Soria-Hernández, C., Serna-Saldívar, S., Chuck-Hernández, C. (2015) Physicochemical and Functional Properties of Vegetable and Cereal Proteins as Potential Sources of Novel Food Ingredients. *Food Technol. Biotechnol.* **53**, 269–277.

Stone, A. K., Karalash, A., Tyler, R. T., Warkentin, T. D., Nickerson, M. D. (2015) Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Res. Int.* **76**, 31–38.

Stryer, L. (1991) Uvod u građu i funkciju proteina. U: Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, str. 11-39.

Tang, C. H., Wang, X. S., Yang, X. Q. (2009) Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chem.* **114**, 1484–1490.

Tang, C. H., Ten, Z., Wang, X. S., Yang, X. Q. (2006) Physicochemical and Functional Properties of Hemp (*Cannabis sativa* L.) Protein Isolate. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 8945-8950.

Martínez-Maqueda, D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Miralles, B., Gómez-Ruiz, J. A., Toldrá, F., (2013). Extraction/Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion. U: Proteomics in Foods: Principles and Applications, (Nollet, L. M. L., ured.), Springer Science+Business Media New York, str. 21-50.

Vranešić-Bender, D. (2007) Vegetarijanstvo. Hrvatski časopis za javno zdravstvo [online] **3**, br. 9, 2035, <<http://www.hcjz.hr/index.php/hcjz/index>> . Pristupljeno 20. kolovoza 2016.

Wang X. S., Tang, C. H., Yang, X. Q., Gao, W. R. (2008) Characterization, amino acid composition and in vitro digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins. *Food Chem.* **107**, 11–18.

Owusu-Apenten, R. K. (2000) Testing protein functionality. U: Proteins in food processing, (Yada, R. Y., ured.), Woodhead Publishing Limited, London, str. 217-244.

Yilmaz, E., Emir, D. D. (2015) Extration and Functional Properties of Proteins from Pre-roasted and Enzyme Treated Poppyseed (*Papaver somniferum* L.) Press Cakes. *J. Oleo Sci.* **65**, 319-329.

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