

Utjecaj različitih koncentracija škroba na funkcionalna svojstva izolata proteina boba

Piljek, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:630345>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Luka Piljek

**UTJECAJ RAZLIČITIH
KONCENTRACIJA ŠKROBA NA
FUNKCIONALNA SVOJSTVA
IZOLATA PROTEINA BOBA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za održivi razvoj na Zavodu za opće programe Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

UTJECAJ RAZLIČITIH KONCENTRACIJA ŠKROBA NA FUNKCIONALNA SVOJSTVA IZOLATA
PROTEINA BOBA

Luka Piljek, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058211078

Sažetak:

Porastom broja svjetske populacije raste i potreba za hranom koja je u ograničenim količinama. Veliki udio svjetske populacije svoju prehranu temelji na hrani animalnog porijekla, stoga znanstvenici širom svijeta teže pronalasku adekvatne zamjene namirnicama animalnog porijekla kao što su namirnice bogate biljnim proteinima. Cilj ovog rada bio je analizirati funkcionalna svojstva izolata proteina boba, jednog od potencijalnih kandidata koji bi zamijenio životinjske proteine, u kombinaciji s različitim koncentracijama škroba u svrhu poboljšanja nekih funkcionalnih svojstva, pri različitim pH vrijednostima. Određena je topljivost proteina, njihova sposobnost emulgiranja i pjenjenja te zadržavanja vode. Rezultati su pokazali da dobivene vrijednosti uvelike ovise o pH okoline te bi se, pri određenim pH vrijednostima, bob mogao koristiti kao dodatak nekim prehrambenih proizvodima.

Ključne riječi: *Vicia faba* L., škrob, izolat proteina, funkcionalna svojstva, pH vrijednost

Rad sadrži: 59 stranica, 26 slika, 4 tablica, 65 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv.prof.dr.sc. Mojca Čakić Semenčić (predsjednica)
2. prof.dr.sc. Anet Režek Jambrak (mentorica)
3. izv.prof.dr.sc. Sven Karlović (član)
4. doc.dr.sc. Filip Šupljika (zamjenski član)

Datum obrane: 19. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department for General Programmes
Laboratory for sustainable development

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Safety Management

THE INFLUENCE OF DIFFERENT STARCH CONCENTRATIONS ON THE FUNCTIONAL
PROPERTIES OF BEAN PROTEIN ISOLATES

Luka Piljek, univ. bacc. ing. techn. aliment.

0058211078

Abstract:

As the world's population grows, so does the need for food, which is in limited quantities. A large part of the world's population bases its diet on food of animal origin, so scientists around the world strive to find an adequate replacement for foods of animal origin, such as protein rich plants. The aim of this work was to analyze the functional properties of bean protein isolate, one of the potential candidates to replace animal proteins, in combination with different concentrations of starch in order to improve some functional properties, at different pH values. The solubility of proteins, their ability to emulsify and foam and retain water was determined. The results showed that the obtained values largely depend on the pH of the environment and, at certain pH values, beans could be used as a supplement to some food products.

Keywords: *Vicia faba* L., starch, protein isolate, functional properties, pH value

Thesis contains: 59 pages, 26 figures, 4 tables, 65 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) forms deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Anet Režek Jambrak, PhD, Full professor

Reviewers:

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

Thesis defended: September 19, 2022

Sadržaj:

1. UVOD.....	8
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BOB (<i>Vicia faba</i> L.).....	2
2.2. AGROKOLOŠKI UVJETI ZA UZGOJ BOBA	3
2.3. SJETVA BOBA I UZGOJ	3
2.4. BERBA I SKLADIŠTENJE BOBA	4
2.5. SVJETSKA PROIZVODNJA.....	4
2.6. PROIZVODI OD BOBA	4
2.7. NUTRITIVNI SASTAV BOBA	5
2.8. MINERALI I VITAMINI U BOBU	7
2.9. ŠKROB I FIZIKALNO KEMIJSKA SVOJSTVA ŠKROBA BOBA.....	7
2.10. IZOLACIJA ŠKROBA IZ BOBA.....	8
2.11. OKUS BOBA I POBOLJŠANJE OKUSA TOPLINSKOM OBRADOM	8
2.12. FUNKCIONALNA SVOJSTVA	9
2.12.1. Topljivost	9
2.12.2. Emulgiranje.....	9
2.12.3. Sposobnost / kapacitet zadržavanja vode.....	10
2.12.4. Pjenjenje.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI	13
3.1.1. Uzorak.....	13
3.1.2. Kemikalije.....	13
3.1.3. Aparatura.....	14
3.1.4. Pribor.....	14
3.2. METODE	15
3.2.1. Ispitivanje topljivosti proteina te određivanje ukupnih proteina metodom po Lowryju 15	
3.2.2. Određivanje svojstava emulgiranja proteina.....	15
3.2.3. Kapacitet i stabilnost pjenjenja	17
3.2.4. Određivanje kapaciteta vezanja vode.....	19
3.2.5. Obrada podataka	20

4. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
4.1. ISPITIVANJE TOPLJIVOSTI PROTEINA TE ODREĐIVANJE UKUPNE KOLIČINE PROTEINA METODOM PO LOWRYJU	23
4.2. ODREĐIVANJE SVOJSTAVA EMULGIRANJA PROTEINA	24
4.2.1. Omjer proteini:škrob = 90:10	24
4.2.2. Omjer proteini:škrob = 70:30	26
4.2.3. Omjer proteini:škrob = 50:50	28
4.3. KAPACITET I STABILNOST PJENJENJA	34
4.3.1. Omjer proteini:škrob = 90:10	34
4.3.2. Omjer proteini:škrob = 70:30	35
4.3.3. Omjer proteini:škrob = 50:50	37
4.4. ODREĐIVANJE KAPACITETA VEZANJA VODE.....	40
4.4.1. Omjer proteini:škrob = 90:10	40
4.4.2. Omjer proteini:škrob = 70:30	41
4.4.3. Omjer proteini:škrob = 50:50	41
5. ZAKLJUČCI	44
6. LITERATURA	46

1. UVOD

Porastom broja svjetske populacije raste i potreba za hranom. Problem koji vlada u svijetu je ograničenost resursa i neravnomjerna raspodjela istih između bogatijih i siromašnijih zemalja svijeta. Predviđa se da u budućnosti neće biti dovoljno hrane za sve ako se broj svjetske populacije i dalje bude povećavao. Veliki udio svjetske populacije svoju prehranu temelji na hrani animalnog porijekla, stoga znanstvenici širom svijeta teže pronalasku adekvatne zamjene namirnicama animalnog porijekla. Neki znanstvenici zamjenu pronalaze u namirnicama biljnog porijekla čiji nutritivni sastav donekle odgovara sastavu namirnica animalnog porijekla. Posebno se daje važnost biljnim proteinima koji po svojoj strukturi i funkcionalnim svojstvima mogu zamijeniti proteine životinjskog porijekla. Jedna od namirnica biljnog porijekla koja bi mogla zadovoljiti kriterije i djelomično zamijeniti namirnice životinjskog porijekla je bob.

Bob (*Vicia faba* L.) ili engl. (*faba bean, broad bean, horse bean*) je vrsta biljke iz porodice *Fabaceae* i četvrta je najčešće uzgajana zimska mahunarka nakon graška, slanutka i leće (FAO, 2020). Bob je hranjiva mahunarka otporna na hladnoću, naširoko se uzgaja diljem svijeta. Kina, Etiopija, Velika Britanija, Australija i Francuska glavni su proizvođači boba. Posljednjih godina raste interes za zdravstvenim i prehrambenim prednostima boba i razvojem različite hrane obogaćene biomolekulama s poboljšanom funkcionalnošću, nutritivnom vrijednošću i zdravstvenim prednostima. Sjemenke boba su bogat izvor ugljikohidrata (51-68 %), a glavni ugljikohidrat je škrob (22-45 %); (Hoover i Sosulski, 1991.). Prema jednom istraživanju sjemenke boba sadrže 35 % škoba i 36 % proteina (Ross i Davies, 1992). Zbog većeg sadržaja amiloze u usporedbi sa škrobnim žitaricama, škrobovi mahunarki pružaju osebujna svojstva poput visoke temperature geliranja, brze retro-gradacije, škroba visoke otpornosti (RS) i veće elastičnosti gela u prehrambenim sustavima (Ratnayake i sur., 2002).

Cilj ovog istraživanja bio je analizirati složeni sustav, škrob/proteini, te kako dodatak različitih koncentracija škroba iz boba utječu na funkcionalna svojstva (topljivost, pjenjenje, sposobnost zadržavanja vode, emulgiranje) izolata proteina iz boba sa svrhom mogućeg korištenja u novim prehrambenim proizvodima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BOB (*Vicia faba* L.)

Bob je jednogodišnja biljka razgranjena korijenom te ima zeljastu i šuplju stabljiku visine 60 – 80 cm. Cvjetovi su bijele boje sa crnim šarama, a nakon cvatnje razvijaju se mesnate debele mahune, koje rastu postupno. Kada narastu do konačne veličine, dužine su oko 30 cm i u sebi mogu imati 4 - 8 velikih zelenih zrna (Slika 1). Kako zore, mahune su isprva mekane, unutar mahune je spužvasto bijelo tkivo u kojem zriju sjemenke te postaju tvrđe i mijenjaju boju iz zelene u bijelo-zelenkastu boju. Sjemenke su izrazito velike, a beru se dok su još zelene (Singh i sur., 2013). Bob sadrži mnogo vitamina B-skupine, fosfora i željeza. Od stabljike biljke mogu se dobiti vlakna, a spaljene stabljike sadrže dosta kalija i mogu poslužiti za izradu sapuna. Sjemenke boba sadrže tvari koje se koriste u liječenju Parkinsonove bolesti te tvari zbog kojih je prirodna alternativa Viagra. Ponegdje se konzumira i sirov, ali ne treba pretjerati s tim, jer može izazvati opstipaciju i simptome slične žutici. Bob je bogat izvor proteina bogatih lizinom, ugljikohidratima, mineralima, vitaminima i brojnim bioaktivnim spojevima. Bob je dobar izvor L-3,4-dihidroksifenilalanina (L-DOPA) koji je prekursor dopamina i može se potencijalno koristiti za liječenje Parkinsonove bolesti (Cardador-Martínez i sur., 2012). Sjemenke boba mogu se konzumirati suhe, pečene, namočene, kuhane, smrznute ili konzervirane. Međutim, brojni antinutritivni spojevi kao što su fitinska kiselina, inhibitori tripsina, saponini, vicin i konvicin (spojevi koji izazivaju favizam, genetski uzrokovan nedostatak glukozo-6-fosfat dehidrogenaze), lektini i kondenzirani tanini negativno utječu na biološku vrijednost boba. Za proširenje upotrebe boba u ljudskoj prehrani potrebno je uklanjanje ovih antinutrijenata (Sharma, 1992).



Slika 1. *Vicia faba* L. (Anonymus, 2020)

2.2. AGROEKOLOŠKI UVJETI ZA UZGOJ BOBA

Bob je biljka dugog dana koja se najbolje razvija tijekom hladne sezone te se može rano sijati. Usjev se uzgaja kao zimska jednogodišnja biljka u umjereno toplim i suptropskim područjima. Tijekom sezone rasta bob zahtijeva malo topline; optimalne temperature za rast kreću se od 18 do 27°C (65–85°F) (Link i sur., 2010; Duke, 1981). Do početka cvatnje biljka boba ima skromne zahtjeve za vodom, ali nakon cvatnje dobra opskrba vodom bitna je za prinos mahuna i zrna. Bob kasnije sazrijeva zbog svoje duže vegetacijske sezone. Usjevi koji će se sijati nakon berbe boba imati će koristi jer će iz tla apsorbirati hranjive tvari i zaostali dušik nastao fiksacijom tijekom prošlogodišnje vegetacijske sezone boba .

2.3. SJETVA BOBA I UZGOJ

Za bob su najprikladnija srednje teška tla, dobre propusnosti za vodu i kapaciteta za zrak, uz pH tla 7 do 8. Bob najbolje raste na tlu koje je smjesa gline, pijeska i humusa, ali tolerira gotovo sve vrste tla. Na lakšim tlima, bob posijan u proljeće može patiti od suše tijekom ranih ljetnih mjeseci što može štetno utjecati na prinose. Nažalost, bob se često uzgaja na tlima slabije kvalitete

i uobičajeno se smatra nižim prioritetom u sustavu usjeva od strane poljoprivrednika što može dovesti do kasne sjetve, suše uzrokovane nedostatkom vode, loše kontrole korova, kasne žetve i gubitka zrna. U područjima poput Mediterana gdje temperature zimi nisu niže od $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$, bob se može sijati od početka listopada pa do kraja prosinca. U primorskom zaleđu bob se sije u veljači, a u kontinentalnom području u ožujku i početkom travnja. Dubina na koju se sije je od 5 – 10 cm, ovisno o veličini sjemena (PGRO, 2008; Duke, 1981)

2.4. BERBA I SKLADIŠTENJE BOBA

Za upotrebu u svježem stanju mladih mahuna ili mladog zrna bob se bere višekratno. U uvjetima navodnjavanja prinos mahuna može doseći 30 t/ha, a bez navodnjavanja 6 – 12 t/ha. Bob za preradu uz mehaniziranu berbu može dati prinos zrna do 5 t/ha. Mahune boba mogu se skladištiti do 2 tjedna pri temperaturi od $7 - 9\text{ }^{\circ}\text{C}$ i relativnoj vlazi zraka 90 – 95 % (Lešić i sur., 2002).

2.5. SVJETSKA PROIZVODNJA

Svjetska proizvodnja boba iznosila je 5,43 milijuna tona u 2019., što je predstavljalo povećanje od oko 25% u usporedbi s 4,35 milijuna tona iz 1990. U svijetu, Azija prednjači s 33,55 % ukupne proizvodnje boba na globalnoj razini, a slijede Europa (EU) i Afrika, s 29,36 % odnosno 27,04 % ukupne proizvodnje (FAO, 2020). Kina je bila vodeći proizvođač boba u svijetu, a nakon Kine Etiopija; ove dvije zemlje predstavljale su oko 50 % ukupne svjetske proizvodnje (FAO, 2020).

2.6. PROIZVODI OD BOBA

Bob se smatra važnom poljoprivrednom kulturom s ekološkog, prehrambenog i ekonomskog stajališta (Xiao i sur., 2021). To je višenamjenski usjev koji se uzgaja prvenstveno kao izvor hrane za ljudsku populaciju koja živi u Aziji i Africi, kao stočna hrana i silaža u Europi te kao usjev koji fiksira atmosferski dušik u tlu čime se značajno smanjuje primjena sintetskih gnojiva u poljoprivredi (Zhou i sur., 2018). Bob se može koristiti za proizvodnju različitih prehrambenih proizvoda bogatih hranjivim tvarima. Upotreba brašna boba, izolata proteina ili

škroba bila je zabilježena u tjestenini (Rosa-Sibakov i sur., 2016; Tazrart i sur., 2016), špagetima (Giménez i sur., 2013), kruhu (Sozer i sur., 2019), tofuu (Jiang i sur., 2020; Zee i sur., 1987), jogurtu (Jiang i sur., 2020), kao djelomičnoj zamjeni za meso/mast u goveđim pljeskavicama (Sulaiman i sur., 2018), kao zamjena žumanjka u majonezi (Ouraji i sur., 2020) te mesnim analognim proizvodima (Carmo i sur., 2021).

2.7. NUTRITIVNI SASTAV BOBA

Bob je važan hranjivi sastojak mahunarke bogat na proteinima, posebno proteinima koji u svom sastavu imaju aminokiselinu lizin. Osim proteina, bob u svom sastavu sadrži i složene ugljikohidrate, dijetalna vlakna, nehranjive sekundarne metabolite i bioaktivne spojeve (antioksidansi, fenoli i γ -aminomaslačna kiselina) koji imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje (Liu i sur., 2022; Khazaei i sur., 2019). Bob je dobar izvor mnogih makro- i mikroelemenata, uključujući minerale (Rahate i sur., 2020.; Haciseferogullar i sur., 2003). Sastav sirovog i termički obrađenog boba u nezreloj i zreloj fazi prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Razlika nutritivnog sastava zrelog i nezrelog kuhanog i sirovog boba (USDA, 2021)

SASTOJAK	JEDINICA	NEZRELI BOB		ZRELI BOB	
		SIROVI	KUHANI (sa soli)	SIROVI	KUHANI (sa soli)
Voda	g	81	83,7	10,98	-
Energija	kcal/kJ	72/301	62/259	341/1425	110/460
Proteini	g	5,6	4,8	26,12	7,6
Lipidi	g	0,6	0,5	1,53	0,4
Pepeo	g	1,1	0,9	3,08	-
Ugljikohidrati	g	11,7	10,1	58,29	19,6
Vlakna	g	4,2	-	25	5,4
Vitamin C	mg	33	19,8	1,4	0,3
Niacin	mg	1,5	1,2	2,832	0,7
Folat	μ g	96	58	423	104,1
Vitamin A	IU	350	270	53	15,0
Vitamin K	μ g	-	-	9	2,9
Kalcij	mg	22	18	103	36,0
Željezo	mg	1,9	1,5	6,7	1,5
Magnezij	mg	38	31	192	43,0

Fosfor	mg	95	73	421	124,7
Kalij	mg	250	193	1,062	268,2
Natrij	mg	50	277	13	5,0
Cink	mg	0,58	0,47	3,14	1,0

Nutritivno gledano, zrele sjemenke boba bogate su proteinima (26,1%), ugljikohidratima (58,3%) i dijetalnim vlaknima (25,0%) (USDA [Ministarstvo poljoprivrede SAD-a], 2021.). Bob sadrži dvostruko više proteina od žitarica, a njihova količina ovisi o sorti, gnojidbi, mjestu sadnje i sezoni rasta. Aminokiselinski se sastav razlikuje kod zrelih i nezrelih sjemenki, a sadrži neesencijalne aminokiseline (prolin, serin, alanin, aparaginska kiselina, glutainska kiselina, agrinin, glicin) kao i esencijalne aminokiseline (leucin, izoleucin, valin, histidin, metionin, fenilalanin, tirozin, treonin, triptofan) (Dhull i sur., 2021). Bob sadrži razne bioaktive spojeve poput fenola i flavonoida koji imaju dokazano antioksidativno djelovanje (Valente i sur., 2018). Uz nutritivno bogate spojeve bob sadrži i neke nehranjive spojeve kao što su lektini, saponini, inhibitori tripsina, fitinske kiseline, kondenzirani tanini i spojevi koji izazivaju favizam. Navedeni spojevi imaju negativan utjecaj na biološku vrijednost mahunarke boba (Revilla, 2015). Konzumacija boba može uzrokovati bolest zvanu favizam—teški oblik hemolitičke anemije (Mínguez i Rubiales, 2021; Singh i sur., 2013). Hulse (1994) je izvijestio da je koncentracija lektina (hemaglutinini) viša u bobu nego u drugim mahunarkama. Bob sadrži oligosaharide poput stahioze i rafinoze (Toklu i sur., 2021) koji mogu fermentirati i stvarati nadutost uzrokujući nelagodu u trbuhu (Toklu i sur., 2021). Lektini se uništavaju tijekom uobičajenih procesa kuhanja zbog visoke topline. Labba i sur. (2021) i Singh i sur. (2013) izvijestili su da osim kuhanja, klijanje smanjuje udio nutritivno siromašnih spojeva u bobu čime se poboljšava njegova nutritivna kvaliteta za ljudsku prehranu. Bob je uobičajena hrana za doručak na Bliskom istoku, Mediteranskoj regiji, Kini i Etiopiji. Najpopularnija jela od boba su Medamis (pirjani grah), Falafel (duboko pržena pasta od kotiledona s malo povrća i začina), Bissara (umak od kotiledona) te nabet juha pripremljena od kuhanih proklijalih zrna boba (Singh i sur., 2013).

2.8. MINERALI I VITAMINI U BOBU

Zabilježeno je da su u bobu prisutni različiti minerali (natrij, kalij, kalcij, bakar, cink, željezo, mangan, magnezij, fosfor i sumpor) (USDA, 2021; Nosworthy i sur., 2018; Luo i sur., 2008; Khalil i Mansour, 1995). Visok sadržaj kalija (1,062 mg/100 g) i nizak sadržaj natrija (13 mg/100 g) u zreom sjemenu boba optimalan je za osobe koje pate od hipertenzije i osobe koje su na dijeti s malo natrija. Nasuprot tome, nezrele sjemenke boba imaju viši sadržaj natrija i niži sadržaj kalija, 50 mg/100g odnosno 250 mg/100 g (USDA, 2021.). Bob je dobar izvor folata, esencijalnog kofaktora uključenog u sintezu pirimidina, purina i aminokiselina (Hefni i sur., 2015.). Većina fosfora u bobu je nedostupna jer se nalazi u formi fitata koji su odgovorni za štetne učinke na ljudsko zdravlje (Luo i sur., 2012).

2.9. ŠKROB I FIZIKALNO KEMIJSKA SVOJSTVA ŠKROBA BOBA

Škrob je polisaharid koji se sastoji od amiloze i amilopektina. Amiloza je ravni polimerni lanac sastavljen od velikog broja glukoznih jedinica međusobno povezanih $\alpha(1-4)$ glikozidnim vezama dok su kod amilopektina molekule glukoze međusobno povezane $\alpha(1-6)$ glikozidnim vezama te tvore razgranate polimerne lance. Primjena škroba mahunarki u hrani i prehrambenoj industriji ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim i strukturnim svojstvima. Škrob ima važnu ulogu u održavanju kvalitete prehrambenih proizvoda jer utječe na teksturu proizvoda, hidratacijska svojstva, toplinsku stabilnost, pjenjenje te procesiranje tijekom prerade (Kaur i sur., 2013; Hoover i sur., 2010). Zhang i sur., (2019) su utvrdili da se u izoliranom škrobu boba čistoće 96,64 % nalazi 33,55 % amiloze, 0,30 % proteina, 0,38 % zaostalnih masti i 0,07 % sadržaja pepela. Amiloza i amilopektin dvije su primarne molekule prisutne u škrobnim granulama te sadržaj amiloze i duljine grana lanca amilopektina određuju strukturna svojstva koja definiraju funkcionalnost škroba i njegovu probavljivost (Jane, 2006). Amilopektini prisutni u škrobu boba sastoje se od različitih duljina lanaca molekula glukoze. Manji lanci izgrađeni od 6 do 12 molekula glukoze čine 21,5 % ukupnog amilopektina dok lanci izgrađeni od 13 do 24 molekula glukoze čine 56 % ukupnog amilopektina. Prosječna duljina lanca amilopektina prisutnog u škrobu boba iznosi 20,4 molekula glukoze u lancu (Li i sur., 2019). Topljivost škroba ovisi o prisutnosti molekula koje su topive u vodenim otopinama (Tester i Morrison, 1990). Topljivost škroba iz boba pri temperaturi od 90 °C iznosila je samo 9,92 %. Razlog niže topljivosti posljedica su integracije škrobnih granula

i međusobno jako povezivanje molekula unutar samog škroba koje uzrokuju taloženje i smanjuju moć bubrenja (Zhang i sur., 2019). Moć bubrenja je sposobnost hidratacije škroba pri određenoj temperaturi i određenom sadržaju vode. Veća moć bubrenja škroba ukazuje na slabe međumolekulske sile vezanja unutar samog škroba (Hoover i Manuel, 1996). Zhang i sur. (2019) dokazali su moć bubrenja od 12,67 g/g za škrob izoliran iz mahunarke boba.

2.10. IZOLACIJA ŠKROBA IZ BOBA

Tijekom izolacije škrobne frakcije iz mahunarki boba, netopivi proteini i netopiva vlakna talože se sa škrobom u obliku smeđeg taloga te otežavaju proces izolacije škroba (Ratnayake i sur., 2002; Hoover i Sosulski, 1991). Za izolaciju škroba mokro frakcioniranje je djelotvornije nego suho frakcioniranje. Li i sur. (2019) koristili su alkalno frakcioniranje kao metodu za izolaciju škroba iz boba. Postotak čistoće škrobne frakcije ovisi o samoj vrsti metode koja se koristi za izolaciju škroba te škrobovi sa niskim sadržajem proteina, pepela i zaostalih masti ukazuju na visoku čistoću škrobne frakcije (Wang i sur., 2014).

2.11. OKUS BOBA I POBOLJŠANJE OKUSA TOPLINSKOM OBRADOM

Bob koji se koristi za ljudsku ishranu može biti lošeg okusa ako nisu sva zrna pravilno termički obrađena. U jednom istraživanju opisan je postupak toplinske obrade sjemenki boba. Prethodnim zagrijavanjem boba u mikrovalnoj pećnici učinkovito se i brzo inaktiviralo enzime peroksidazu i lipoksigenazu koji su nositelji nepoželjnog "okusa po grahu" u zrnima. Mikrovalno grijanje na 950W tijekom 90 sekundi bilo je dovoljno da se enzimi inaktiviraju i poboljša kvaliteta mljevenja boba. Vrijeme zagrijavanja mikrovalovima od 2 minute i više uzrokovalo je veće smanjenje topljivosti proteina i smanjenje ljepljivosti brašna bez značajnog poboljšanja kvalitete mljevenja zrna boba. Konvencionalno grijanje u pećnici na temperaturi od 170 °C tijekom 30 minuta, također je inaktiviralo peroksidaze i lipoksigenaze. Sve toplinske metode u kojima se koristi zagrijavanje stvarale su škrobne proteinske agregate koji su bili netopivi u vodi. Utvrđeno je da je mikrovalno zagrijavanje cijelih zrna boba na 950 W tijekom 90 sekundi optimalna metoda za denaturaciju enzima povezanih s lošim okusom te optimalna metoda za poboljšanje tehnološke

upotrebe hrane i njezinih svojstva kao što su kvaliteta mljevenja i svojstva lijepljenja (Jiang i sur., 2015).

2.12. FUNKCIONALNA SVOJSTVA

Pojam 'funkcionalnost' podrazumijeva različite koncepte za znanstvenike i ovisi o njihovom području interesa. Izraz se često koristi za označavanje bilo kojeg svojstva proteina koje utječe na njegovu upotrebu, bilo kao pomoćnog sredstva u proizvodu ili kao izravnog u proizvodima. Funkcionalni zahtjevi sastojaka proteinske hrane ovise i o svojstvima željenog proizvoda i o ponašanju sastojaka tijekom odabranog procesa. Funkcionalna svojstva koja se obično povezuju s proteinima kao sastojcima hrane su: boja, okus, tekstura, glatkoća, zamućenost, topljivost, bubrenje, želiranje, zadržavanje vode, sinereza, viskoznost, emulgiranje, pjenjenje, stabilizacija, elastičnost, zrnatost, sposobnost žvakanja, adhezija, formiranje vlakna i ekstrudabilnost (Kinsella, 1984).

2.12.1. Topljivost

Topljivost je vjerojatno najvažnije funkcionalno svojstvo proteina koje utječe na mnoga druga funkcionalna svojstva poput pjenjenja, emulgiranja i geliranja. Topljivost proteina ovisi o molekularnoj težini, asocijaciji i disocijaciji, broju ionskih bočnih lanaca i hidrofobnosti. Kod različite vrijednosti pH otopine proteini imaju različitu topljivost. Razlog različite topljivosti proteina ovisi o aminokiselinama koje grade proteine i o njihovom protoniranom ili deprotoniranom obliku ovisno o mediju (kiseli i alkalni) u kojem se nalaze (Kinsella, 1981).

2.12.2. Emulgiranje

Emulgiranje je najvažniji proces u proizvodnji mnogih prehrambenih proizvoda. Prehrambene emulzije klasificiraju se kao makroemulzije s veličinom kapljica od 0,2 do 50 μm . Emulzija predstavlja heterogenu smjesu masnih kuglica. Prehrambene emulzije mogu biti tipa ulje u vodi ili voda u ulju. Razlika između emulzija je u tome što emulzija ulje u vodi obično ima kremastu teksturu, dok emulzija voda u ulju ima svojstva masne teksture (Nakai i Powerie, 1981).

Emulgirajuća aktivnost proteina je sposobnost proteina da sudjeluje u stvaranju emulzije i stabilizira novonastalu emulziju. Kapacitet emulgiranja je sposobnost otopine ili suspenzije proteina da emulgira ulje. Svojstva emulgiranja korisna su funkcionalna svojstva koja imaju važnu ulogu u razvoju novih izvora biljnih proteinskih proizvoda za upotrebu u hrani. Proteini su komponente koje dominiraju u većini prehrambenih emulzija. Karakteristike koje se koriste za opisivanje emulgirajućih svojstava proteina su kapacitet emulgiranja, stabilnost emulzije i emulgirajuća aktivnost. Kapacitet emulgiranja je količina ulja (mL) koja je emulgirana u određenim uvjetima s 1 g proteina. Kapacitet emulgiranja emulgatora ovisi o njegovoj sposobnosti da formira adsorpcijske filmove oko kuglica i da smanji međufaznu napetost na granici ulje-voda (Nakai i sur., 1980). Stabilnost emulzije je sposobnost kapljica emulzije da ostanu raspršene bez odvajanja. Emulzijska aktivnost je najveća međufazna površina (cm²) po 1 g proteina stabilizirane emulzije. U određenim je namirnicama prirodni proteinski sastojak učinkovit stabilizator. Proteini su učinkoviti površinski aktivni agensi jer imaju sposobnost snižavanja međupovršinske napetosti između hidrofobnih i hidrofilnih komponenti u hrani. Proteini sudjeluju u stvaranju emulzija ulja u vodi i vode u ulju te stabiliziraju nastale emulzije. Stabilizirajući učinak proteina u emulzijskom sustavu rezultat je stvaranja zaštitne barijere oko kapljica masti, sprječavajući spajanje emulzije. Sposobnost emulgiranja proteina ovisi o obliku, naboju i hidrofobnosti proteinskih molekula, neutralnosti dipola, hidrataciji polarnih skupina. Stabilnost emulzije ovisi o jačini ovih interakcija (Zayas, 1997). Za proizvodnju stabilnih emulzija potrebno je odabrati proteinski materijal koji je topiv, ima sposobnost brze adsorpcije na međufaznoj granici, ima dobro raspoređene nabijene skupine i ima sposobnost stvaranja snažnog kohezivnog filma.

2.12.3. Sposobnost / kapacitet zadržavanja vode

Kapacitet zadržavanja vode hrane može se definirati kao sposobnost zadržavanja vlastite i dodane vode tijekom primjene sila, prešanja, centrifugiranja ili zagrijavanja. Hermansson (1986) je definirao sposobnost zadržavanja vode kao fizikalno svojstvo i sposobnost strukture hrane da spriječi otpuštanje vode iz trodimenzionalne strukture proteina. Razina hidratacije proteina i viskoznost tekućih sustava u hrani međusobno su povezani. Najvažnija funkcionalna svojstva proteina povezana su njihovom interakcijom s vodom. Posljedično, interakcije protein-voda određuju funkcionalna svojstva proteina u hrani kao što su vezanje i zadržavanje vode, bubrenje,

topljivost, svojstva emulgiranja, viskoznost, geliranje i sinereza. Kapacitet vezanja vode ograničavajući je faktor u proteinskoj hrani. Zadržavanje vode je preliminarni korak u mnogim procesima proizvodnje hrane. Sposobnost zadržavanja vode važna je u formiranju teksture hrane, posebno kod usitnjenih mesnih proizvoda i pečenih tijesta. Zadržavanje vode u biljnim bjelančevinama koje se koriste kao aditivi u raznim vrstama hrane utječe na karakteristike kvalitete pripremljenih prehrambenih proizvoda. Na zadržavanje vode u hrani snažno utječe pH vrijednost. U izoelektričnom području gdje je neto proteinski naboj na proteinu jednak nuli, a interakcije protein-protein su maksimalne, dolazi do taloženja proteina i otpuštanja vode (Zayas, 1997).

2.12.4. Pjenjenje

Svojstvo proteina da stvaraju stabilne pjene važno je u proizvodnji raznovrsne hrane. Pjena se može definirati kao dvofazni sustav koji se sastoji od zračnih ćelija odvojenih tankim kontinuiranim slojem tekućine koji se naziva lamelarna faza. Pjene za hranu obično su vrlo složeni sustavi, uključujući smjese plinova, tekućina, krutih tvari i površinski aktivnih tvari (Zayas, 1997). Raspodjela veličine mjehurića zraka u pjeni utječe na izgled pjenastog proizvoda i svojstva teksture. Proteini u pjenama pridonose ravnomjernoj raspodjeli mjehurića zraka u strukturi hrane. Najčešće korištena proteinska pjenila su: bjelanjak, želatine, kazein, ostali mliječni proteini, sojini proteini i gluten. Proteini se značajno razlikuju u svojim svojstvima pjenjenja; serumski albumin je izvrsno sredstvo za pjenjenje dok je pročišćeni ovalbumin loš. Proteinska pjenila trebaju imati sljedeća svojstva; pjenila bi trebala stabilizirati pjene brzo i učinkovito pri niskim koncentracijama, trebaju djelovati kao učinkovito sredstvo za stvaranje pjene u rasponu pH koji postoji u raznim namirnicama, trebaju učinkovito djelovati kao sredstvo za stvaranje pjene u mediju s inhibitorima pjene kao što su mast, alkohol ili arome (Zayas, 1997). Najstabilnije pjene nastaju s topljivim proteinima koji mogu međusobno djelovati i stvarati guste viskozne filmove. U nekim je studijama utvrđena korelacija između topljivosti proteina i njihovih svojstava pjenjenja. Teorijska istraživanja sugeriraju da kada se neto naboj proteina poveća, kapacitet pjenjenja je povećan (Zayas, 1997). To je utvrđeno kada su kao sredstva za pjenjenje korišteni sljedeći proteini: bjelanjak jajeta, koncentrat ribljeg proteina, sojin protein i protein iz lista. Proteinske čestice u disperziji mogu stabilizirati pjene jer se nalaze na granici zrak/voda i služe kao fizička prepreka

spajanju mjehurića. Čvrste čestice sudjelovale su u stabilizaciji pjene i njihovim uklanjanjem smanjena je stabilnost pjene. Svojstva pjenjenja proteina ovise o njihovoj sposobnosti da tvore fleksibilan, elastičan, kohezivan međufazni film koji je sposoban uhvatiti i zadržati zrak. Ovaj proteinski film trebao bi zadržati vlagu i trebao bi biti otporan na mehanički stres tijekom stvaranja pjene i skladištenja. Visoka površinska viskoznost ograničava molekularnu fleksibilnost filma tijekom stvaranja pjene kada je potrebna topljivost agensa za pjenjenje, pokretljivost i migracija do sučelja. U pjenama stabiliziranim proteinima, kapljice plina su inkapsulirane viskoelastičnim proteinskim filmom. Mehanizam stvaranja i stabilizacije pjene uključuje sposobnost proteina da formiraju kohezivni proteinski film oko mjehurića plina/zraka. Ovi proteinski filmovi trebaju biti stabilni s dovoljnom mehaničkom čvrstoćom da spriječe pucanje pjene tijekom pjenjenja i naknadne obrade i skladištenja. Viskoelastični proteinski filmovi reagirat će na mehanički stres jer se mogu širiti i sabijati. Stabilnije pjene se dobivaju ako proteini tvore viskoelastične filmove prije nego ako tvore visoko viskozne, ali krute filmove. Na stabilnost pjene utječu međumolekularne interakcije proteina koje utječu na kohezivnost. Fleksibilni proteini tvore pjene s velikim mjehurićima i manjom stabilnošću dok uređeni proteini tvore stabilnije fine pjene (Cherry i McWatters, 1981).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorak

Za provedeno istraživanje korišten je izolat proteina boba (*Vicia faba* L.) koncentracije iznad 85 % te škrob dobiven iz boba, oboje dobiveno od strane tvrtke NutriS d.o.o., Novi Senkovac, Hrvatska.

3.1.2. Kemikalije

- klorovodična kiselina, 37 %-tna (Carlo Erba Reagents S. A. S., Val de Reuil Codex, Francuska)
- klorovodična kiselina, 1 M
Priprema: 20,77 mL 37%-tne klorovodične kiseline (Carlo Erba Reagents S. A. S., Val de Reuil Codex, Francuska) prenese se u odmjernu tikvicu od 250 mL te se nadopuni destiliranom vodom do oznake
- natrijeva lužina, 1 M (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
Priprema: 9,99925 g krutog natrijevog hidroksida odvažuje se i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 250 mL te se nadopuni destiliranom vodom do oznake
- otopina reagensa A
Priprema: 5 g natrijevog karbonata (T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska) i 1 g natrijevog hidroksida (Lach-Ner, Neratovice, Češka) odvažuju se u papirnoj lađici za vaganje i kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 250 mL te se nadopuni destiliranom vodom do oznake
- otopina reagensa B
Priprema: 0,05 g bakrovog (II) sulfata pentahidrata (Lach-Ner, Neratovice, Češka) i 0,1 g kalij, natrij-tartarata (Lach-Ner, Neratovice, Češka) odvažuju se u papirnoj lađici za vaganje i kvantitativno se prenese u bočicu od 10 mL te se nadopuni destiliranom vodom do oznake
- otopina reagensa C
Priprema: 50 mL reagensa A pomiješa se sa 1 mL reagensa B
- Folin-Ciocalteu komercijalni reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Priprema: komercijalni Folin-Ciocalteu reagens raazrijedi se destiliranom vodom u omjeru 1:2

- suncokretvo ulje (Zvijezda plus d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- destilirana voda

3.1.3. Aparatura

- analitička vaga (NBL-254i, Nimbus Analytical Balances, Oxford, SAD)
- vortex miješalica (Dlab, MX-S, Peking, Kina)
- pH metar (MA 5740, Iskra, Ljubljana, Slovenija)
- magnetska miješalica (Dlab, MS-H-S, Peking, Kina)
- UV/VIS spektrofotometar (UV-2600i, SHIMADZU, Zagreb, Hrvatska)
- ručni mikser (Delimano, Family magic mix, Ljubljana, Slovenija)
- centrifuga (EPPENDORF 5430, EPPENDORF, Hamburg, Njemačka)

3.1.4. Pribor

- Laboratorijske čaše (100 mL, 250 mL)
- Odmjerne tikvice (10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL)
- Menzure (100 mL)
- Epruvete
- Staklene pipete
- Stakleni lijevci
- Metalna špatula
- Metalna žličica
- Metalne posude za miksanje
- Papirne lađice za vaganje
- Plastične kivete
- Automatska pipeta

3.2. METODE

3.2.1. Ispitivanje topljivosti proteina te određivanje ukupnih proteina metodom po Lowryju

Za određivanje koncentracije proteina potrebno je izraditi baždarni dijagram na temelju uzoraka proteina poznatih koncentracija. Za provođenje pokusa potrebno je pripremiti otopine reagensa A, reagens B i reagens C te Folin-Ciocalteu reagensa. Reagens A priprema se od 2 % Na_2CO_3 u 0,1 M natrijevoj lužini, reagens B priprema se od 5 % $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ pomiješano u 1 % K, Na – tartaratu, a reagens C priprema se od 50 mL reagens A i 1 mL reagens B. Folin-Ciocalteu reagens je komercijalni reagens koji se razrjeđuje s vodom u odnosu 1:2. U staklene epruvete doda se 0,8 mL pripremljene otopine proteina (koncentracije 0,02 do 0,1 mg/mL) i 4 mL reagensaa C te se otopina promiješa protresanjem i ostavi stajati 10-15 minuta nakon čega se otopini naglo dodaje Folin-Ciocalteu reagens. Ta se otopina promiješa na vortex miješalici i ostavi stajati 40-60 minuta. Dobivenim se otopinama mjeri apsorbancija na UV/VIS spektrofotometru na 740 nm. Mjerenja se ponove za 4 različite pH vrijednosti: 3, 5, 7 i 9.

3.2.2. Određivanje svojstava emulgiranja proteina

Dvokomponentni sustavi (proteini/škrob) pripremljeni su u omjerima 90:10, 70:30 te 50:50

3.2.2.1. Omjer proteini:škrob = 90:10

U čašu od 250 mL izvaže se 5,4 g proteina boba te 0,6 g škroba boba te se nadopuni deioniziranom vodom do oznake čime se dobije 3 %-tna suspenzija. Dobivenoj suspenziji podesi se pH vrijednost (3, 5, 7, 9) dodatkom 1 M NaOH, odnosno 1 M HCl uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici. Dobivena suspenzija podijeli se u dvije paralele od po 100 mL te se svakoj doda po 50 mL suncokretovog ulja (Zvijezda plus d.o.o., Zagreb, Hrvatska). Suspenzija se miješa mikserom na najvećoj brzini 90 sekundi te se dobivenoj emulziji mjeri apsorbancija na UV/VIS spektrofotometru na 500 nm u kiveti debljine 1 cm. Kao slijepa proba koristi se 100 mL deionizirane vode pomiješane sa 50 mL suncokretovog ulja (Zvijezda plus d.o.o.). Za određivanje stabilnosti emulzije dobivene se emulzije ostave stajati na sobnoj temperaturi 10 min te im se nakon toga ponovo mjeri apsorbancija. Mutnoća emulzije izračunava se po sljedećoj formuli:

$$T = 2,303 * \frac{A}{I} \quad /1/$$

pri čemu je T = mutnoća, A = apsorbancija pri 500 nm i I = debljina kivete.

Indeks aktiviteta emulzije izračunava se pomoću jednadžbe:

$$IAE = \frac{2 * T * A * r}{V_U * C * 1000} \quad /2/$$

pri čemu je T = mutnoća, V_U = volumni udio uljne faze, C = masa proteina u jedinici volumena, vodene faze prije pripreme emulzije, A = apsorbancija pri 500 nm te r = faktor razrjeđenja.

Indeks stabilnosti emulzije računa se po sljedećoj formuli:

$$ISE = \frac{T * \Delta t}{\Delta T} \quad /3/$$

pri čemu je T = mutnoća određena na početku, Δt = vremenski interval (10 min = 0.167 h) te ΔT = promjena mutnoće u vremenskom intervalu od 10 minuta.

3.2.2.2. Omjer proteini:škrob = 70:30

U čašu od 250 mL izvaže se 4,2 g proteina boba te 1,8 g škroba boba te se nadopuni deioniziranom vodom do oznake čime se dobije 3 %-tna suspenzija. Dobivenoj suspenziji namjesti se pH vrijednost (3, 5, 7, 9) dodatkom 1 M NaOH, odnosno 1 M HCl uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici. Dobivena suspenzija podijeli se u dvije paralele od po 100 mL te se svakoj doda po 50 mL suncokretovog ulja (Zvijezda plus d.o.o.). Suspenzija se miješa mikserom na najvećoj brzini 90 sekundi te se dobivenoj emulziji mjeri apsorbancija na UV/VIS spektrofotometru na 500 nm u kiveti debljine 1 cm. Kao slijepa proba koristi se 100 mL deionizirane vode pomiješane sa 50 mL suncokretovog ulja (Zvijezda plus d.o.o.). Za određivanje stabilnosti emulzije dobivene se emulzije ostave stajati na sobnoj temperaturi 10 min te im se nakon toga ponovo mjeri apsorbancija.

3.2.2.3. Omjer proteini:škrob = 50:50

U čašu od 250 mL izvaže se 3,0 g proteina boba te 3,0 g škroba boba te se nadopuni deioniziranom vodom do oznake čime se dobije 3 %-tna suspenzija. Dobivenoj suspenziji podesi se pH vrijednost (3, 5, 7, 9) dodatkom 1 M NaOH, odnosno 1 M HCl uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici. Dobivena suspenzija podijeli se u dvije paralele od po 100 mL te se svakoj doda po 50 mL suncokretovog ulja (Zvijezda plus d.o.o.). Suspenzija se miješa mikserom na najvećoj brzini 90 sekundi te se dobivenoj emulziji mjeri apsorbanacija na UV/VIS spektrofotometru na 500 nm u kiveti debljine 1 cm. Kao slijepa proba koristi se 100 mL deionizirane vode pomiješane sa 50 mL suncokretovog ulja (Zvijezda plus d.o.o.). Za određivanje stabilnosti emulzije dobivene se emulzije ostave stajati na sobnoj temperaturi 10 min te im se nakon toga ponovo mjeri apsorbanacija.

3.2.3. Kapacitet i stabilnost pjenjenja

3.2.3.1. Omjer proteini:škrob = 90:10

Na analitičkoj vagi izvaže se 18 grama proteina boba te 2 grama škroba. Smjesa proteina i škroba otopi se u 200 mL deionizirane vode. Potrebno je izvagati 4 takva uzorka te svakom od njih podesiti pH vrijednost (3, 5, 7, 9) nakon čega se svaka otopina podijeli na 2 dijela od 100 mL. Suspenzije se potom miješaju mikserom 15 minuta na najvećoj brzini pri čemu se u intervalima od po 5 minuta uzima 100 mL dobivene pjene koja se važe. Nakon vaganja pjena se vraća u posudu za miksanje te se nastavlja miksat i ponovo 5 minuta. Miksanje i vaganje se ponavlja dok se ne izvrše tri uzastopna mjerenja nakon čega se računa postotak povećanja volumena. Postotak povećanja volumena računa se pomoću sljedeće jednadžbe:

$$\% \text{ povećanja} = \frac{m(100 \text{ mL suspenzije proteina}) - m(100 \text{ mL pjene})}{m(100 \text{ mL pjene})} * 100 \quad /4/$$

Stabilnost pjene mjeri se na način da se 100 mL 10 %-tne suspenzije proteina miješa 15 minuta mikserom na najvećoj brzini nakon čega se 100 mL pjene prebaci u stakleni lijevak koji je uronjen u menzuru od 100 mL te se ostavi na sobnoj temperaturi 15 minuta. Nakon 15 minuta odredi se količina izdvojene tekućine pomoću jednadžbe:

$$M_t = (m_{li} + m_{mt}) - (m_m + m_{li}) \quad /5/$$

pri čemu je m_t – masa ocijedene tekućine iz pjene, m_{li} – masa lijevka, m_{mt} – masa menzure s ocijedenom tekućinom te m_m – masa menzure.

Nakon što se pjena prebaci u lijevak, zabilježi se vrijeme pada prve kapi tekućine. Time je određen indeks stabilnosti pjene. Vrijeme potrebno da se ocijedi sva pjena predstavlja minimalnu stabilnost pjene.

3.2.3.2. Omjer proteini:škrob = 70:30

Na analitičkoj vagi izvaži se 14 grama proteina boba te 6 grama škroba. Smjesa proteina i škroba otopi se u 200 mL deionizirane vode. Potrebno je izvagati 4 takva uzorka te svakom od njih podesiti pH vrijednost (3, 5, 7, 9) nakon čega se svaka otopina podijeli na 2 dijela od 100 mL. Suspenzije se potom miksaju mikserom 15 minuta na najvećoj brzini pri čemu se u intervalima od po 5 minuta uzima 100 mL dobivene pjene koja se važe. Nakon vaganja pjena se vraća u posudu za miksanje te se nastavlja miksati ponovo 5 minuta. Miksanje i vaganje se ponavlja dok se ne izvrše tri uzastopna mjerenja nakon čega se računa postotak povećanja volumena.

3.2.3.3. Omjer proteini:škrob = 50:50

Na analitičkoj vagi izvaži se 10 grama proteina boba te 10 grama škroba. Smjesa proteina i škroba otopi se u 200 mL deionizirane vode. Potrebno je izvagati 4 takva uzorka te svakom od njih podesiti pH vrijednost (3, 5, 7, 9) nakon čega se svaka otopina podijeli na 2 dijela od 100 mL. Suspenzije se potom miksaju mikserom 15 minuta na najvećoj brzini pri čemu se u intervalima od po 5 minuta uzima 100 mL dobivene pjene koja se važe. Nakon vaganja pjena se vraća u posudu za miksanje te se nastavlja miksati ponovo 5 minuta. Miksanje i vaganje se ponavlja dok se ne izvrše tri uzastopna mjerenja nakon čega se računa postotak povećanja volumena.

3.2.4. Određivanje kapaciteta vezanja vode

3.2.4.1. Omjer proteini:škrob = 90:10

U čašu od 50 mL izvaže se 1,5 g proteina boba i 0,1667 g škroba te se doda 50 mL deionizirane vode. Dobivenim otopinama podesi se pH vrijednost te se otopine određenog pH preliju u kivete od 50 mL koje se ostave stajati na sobnoj temperaturi 30 minuta. Kivete se potom centrifugiraju na 8000 okretaja/min u vremenu od 20 minuta nakon čega se iz njih izdvoji supernatant, a kivete sa ostatkom se važu. Kapacitet vezanja vode (water holding capacity - WHC) računa se prema izrazu:

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

pri čemu je M_0 = masa uzorka, M_1 = kiveta sa suhim uzorkom te M_2 = kiveta sa uzorkom nakon centrifugiranja.

3.2.4.2. Omjer proteini:škrob = 70:30

U čašu od 50 mL izvaže se 1,1667 g proteina boba i 0,5000 g škroba te se doda 50 mL deionizirane vode. Dobivenim otopinama podesi se pH vrijednost te se otopine određenog pH preliju u kivete od 50 mL koje se ostave stajati na sobnoj temperaturi 30 minuta. Kivete se potom centrifugiraju na 8000 okretaja/min u vremenu od 20 minuta nakon čega se iz njih izdvoji supernatant, a kivete sa ostatkom se važu.

3.2.4.3. Omjer proteini:škrob= 50:50

U čašu od 50 mL izvaže se 0,8335 g proteina boba i 0,8335 g škroba te se doda 50 mL deionizirane vode. Dobivenim otopinama podesi se pH vrijednost te se otopine određenog pH preliju u kivete od 50 mL koje se ostave stajati na sobnoj temperaturi 30 minuta. Kivete se potom centrifugiraju na 8000 okretaja/min u vremenu od 20 minuta nakon čega se iz njih izdvoji supernatant, a kivete sa ostatkom se važu.

3.2.5. Obrada podataka

Za obradu podataka korišten je Microsoft Office programski paket. Za obradu teksta; pisanje i oblikovanje teksta, oblikovanje stila i veličine fonta, dodavanje tablica, slika i grafikona korišten je program Microsoft Word. Za izradu tabličnih proračuna korišten je program Microsoft Excel. Za statističku obradu podataka korišten je alat za analizu ANOVA (Microsoft Excel).

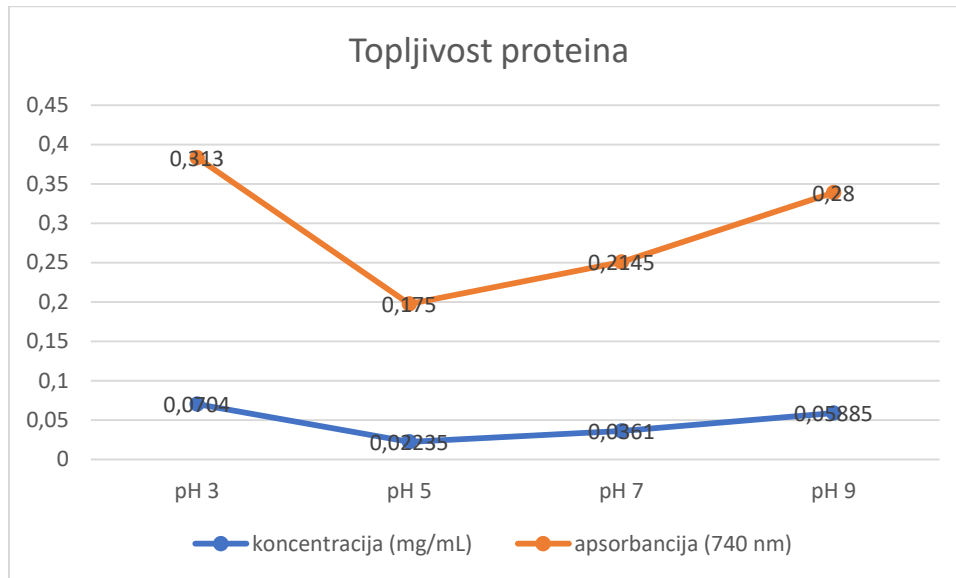
4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je analizirati učinak škroba na funkcionalna svojstva izolata proteina boba pri različitim pH vrijednostima.

Na Slici 2. prikazane su vrijednosti apsorbancija izolata proteina boba pri različitim pH vrijednostima sa pripadajućim koncentracijama (mg/mL). Slika 3. prikazuje vrijednosti apsorbancije emulzija izmjerenih na 500 nm pri različitim pH vrijednostima u slučaju kada je omjer proteina i škroba 90:10. Slika 4. predstavlja grafički prikaz rezultata izračunate mutnoće emulzija kod različitih pH vrijednosti za omjer proteina i škroba 90:10. Slika 5. prikazuje izračunate indekse aktiviteta emulzije pri četiri različite pH vrijednosti za omjer 90:10. Slika 6. prikazuje izgled emulzija kod različitih pH vrijednosti za omjer proteina i škroba 90:10. Slika 7. prikazuje vrijednosti apsorbancija emulzija pri različitim pH vrijednostima za omjer proteina i škroba 70:30. Slika 8. prikazuje vrijednosti mutnoća izračunatih za omjer 70:30 pri svakom od četiri pH. Slika 9. prikazuju indeks aktiviteta emulzije za omjer proteina i škroba 70:30 pri različitim pH vrijednostima. Na Slici 10. vidljivi su izgledi emulzija kod različitih pH za omjer 70:30. Slika 11. prikazuje vrijednosti apsorbancija emulzija za omjer proteina i škroba 50:50 izmjerene pri četiri različita pH. Slika 12. prikazuje izračunate vrijednosti mutnoća za omjer proteina i škroba 50:50. Slika 13. prikazuje indekse aktiviteta emulzija pri različitim pH vrijednostima kod omjera 50:50. Na Slici 14. vidljivi su izgledi emulzija pri različitim pH vrijednostima za omjer proteina i škroba 50:50. Slika 15. prikazuje usporedbu utjecaja različitih koncentracija škroba na vrijednosti apsorbancija mjenjenih na 500 nm pri četiri pH vrijednosti. Slika 16. prikazuje postotak povećanja volumena pjene pri različitim pH vrijednostima i pri različitim vremenima miksanja (5, 10, 15 min) za omjer proteina i škroba 90:10. U Tablici 2. prikazane su vrijednosti indeksa stabilnosti te minimalne stabilnosti pjene za omjer 90:10. Na Slici 17. prikazani su izgledi pjena nakon 15 minuta miksanja pri pH 3 (a), pH 5 (b), pH 7 (c) i pH 9 (d) kod omjera 90:10. Slika 18. prikazuje postotak povećanja volumena pjene pri različitim pH vrijednostima i pri različitim vremenima miksanja (5, 10, 15 min) za omjer proteina i škroba 70:30. U Tablici 3. prikazane su vrijednosti indeksa stabilnosti te minimalne stabilnosti pjene za omjer 70:30. Na Slici 19. prikazani su izgledi pjena nakon 15 minuta miksanja pri pH 3 (a), pH 5 (b), pH 7 (c) i pH 9 (d) kod omjera 70:30. Slika 20. prikazuje postotak povećanja volumena pjene pri različitim pH vrijednostima i pri različitim

vremenima miksiranja (5, 10, 15 min) za omjer proteina i škroba 50:50. U Tablici 4. prikazane su vrijednosti indeksa stabilnosti te minimalne stabilnosti pjene za omjer 50:50. Na Slici 21. prikazani su izgledi pjena nakon 15 minuta miksiranja pri pH 3 (a), pH 5 (b), pH 7 (c) i pH 9 (d) kod omjera 50:50. Slika 22. prikazuje usporedbu utjecaja različitih koncentracija škroba na postotak povećanja volumena pjene pri različitim pH vrijednostima (3, 5, 7, 9). Slika 23. predstavlja grafički prikaz rezultata kapaciteta vezanja vode kod različitih pH vrijednosti za omjer proteina i škroba 90:10. Slika 24. prikazuje kapacitete vezanja vode kod različitih pH vrijednosti za omjer proteina i škroba 70:30. Slika 25. prikazuje kapacitet vezanja vode za omjer proteina i škroba 50:50. Slika 26. prikazuje usporedbu sposobnosti odnosno kapaciteta vezanja vode pri različitim pH vrijednostima te pri različitim omjerima proteina i škroba.

4.1. ISPITIVANJE TOPLJIVOSTI PROTEINA TE ODREĐIVANJE UKUPNE KOLIČINE PROTEINA METODOM PO LOWRYJU



Slika 2. Grafički prikaz apsorbancije sa pripadajućom koncentracijom proteina pri različitim pH vrijednostima

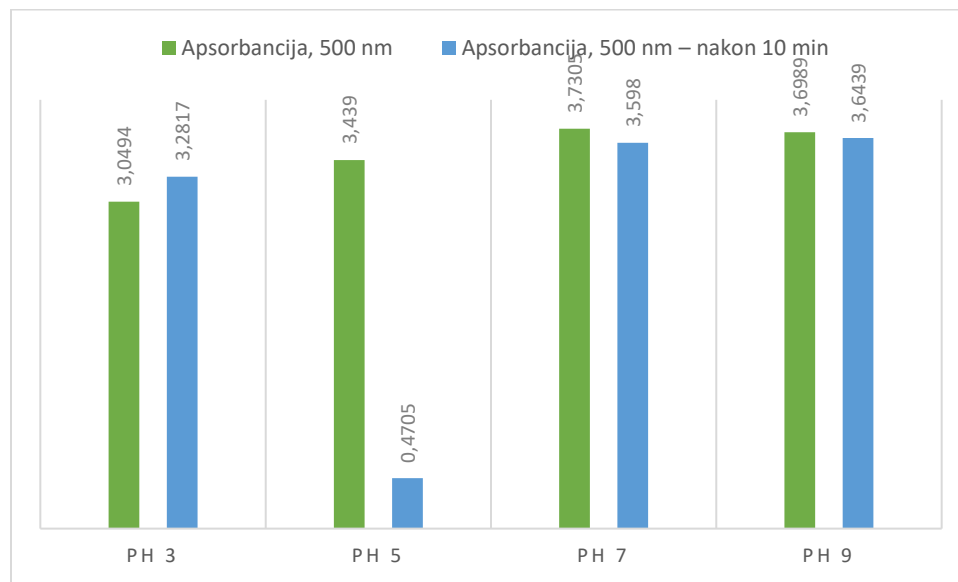
Topljivost proteina određena je metodom po Lowryju u 0,5 %-tnim otopinama izolata proteina pri četiri različita pH: 3, 5, 7 i 9. pH otopine podešen je dodavanjem 1 M klorovodične kiseline odnosno 1 M natrijeve lužine u otopinu proteina.

Topljivost podrazumijeva sposobnost neke tvari da se otopi u određenom otapalu, a to je najčešće ulje ili voda (Awuchi i sur., 2019). Topljivost najviše ovisi o jačini protein-voda interakcija – što su one jače i što je više protein-voda interakcija u odnosu na protein-protein interakcije, to će topljivost biti veća, odnosno veća količina proteina će biti otopljena u otapalu. Osim toga, topljivost ovisi i o molekularnoj masi proteina, aminokiselinskom sastavu, površinskim karakteristikama proteina, pH vrijednosti, temperaturi i ionskoj jakosti (Haque i sur., 2016). Proteini imaju najmanju topljivost u izoelektričnoj točki. Izoelektrična točka je pH vrijednost kod koje je vrijednost električnog naboja neke molekule jednaka nuli. Pri tom pH dominiraju protein-protein interakcije te se proteini vrlo često talože u otopini (Haque i sur., 2016). Iz dobivenih

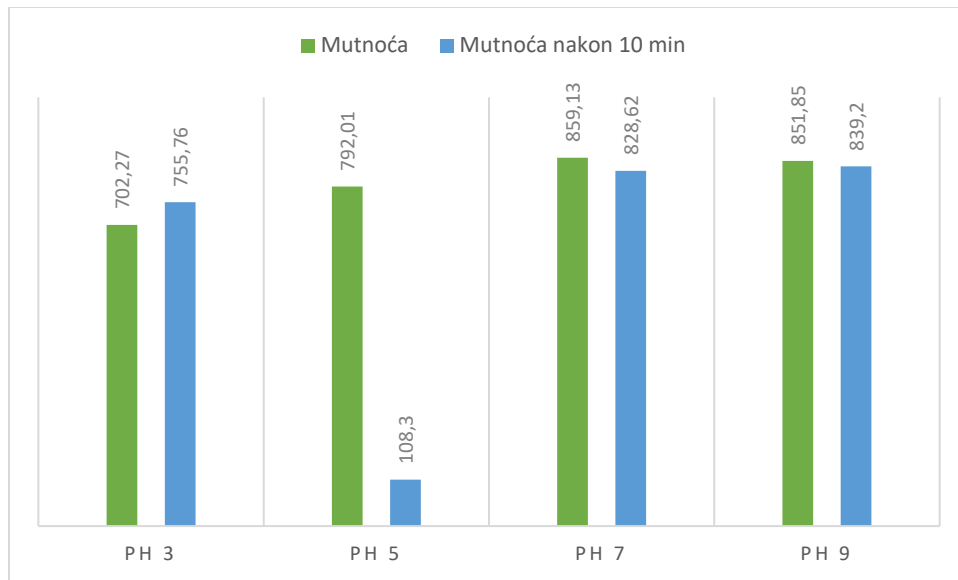
rezultata vidljivo je da je koncentracija otopljenih proteina najveća kod pH 3 (0,0704 mg/mL) te kod pH 9 (0,05885 mg/mL), a najmanja kod pH 5 (0,02235) zbog blizine izoelektričnog pH područja te velikog taloženja proteina.

4.2. ODREĐIVANJE SVOJSTAVA EMULGIRANJA PROTEINA

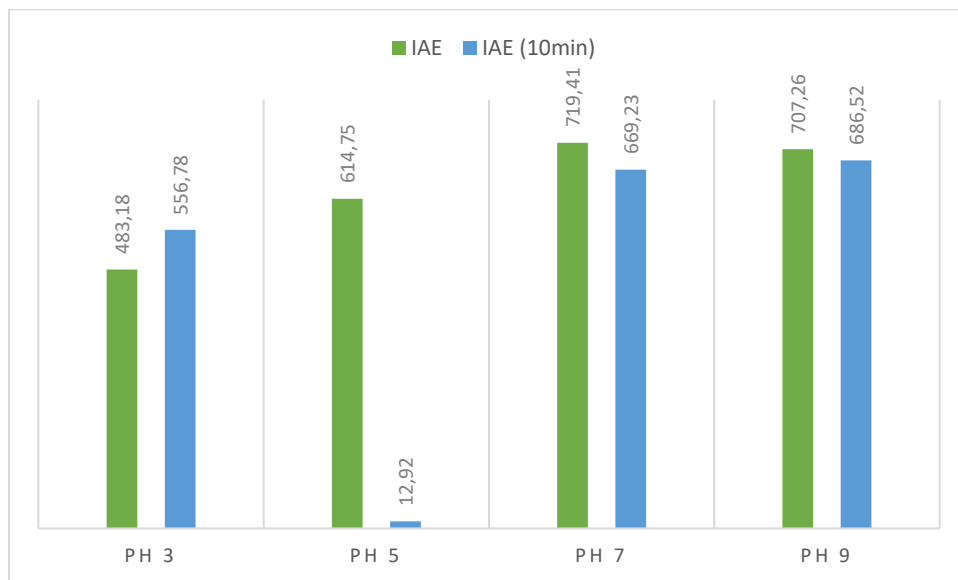
4.2.1. Omjer proteini:škrob = 90:10



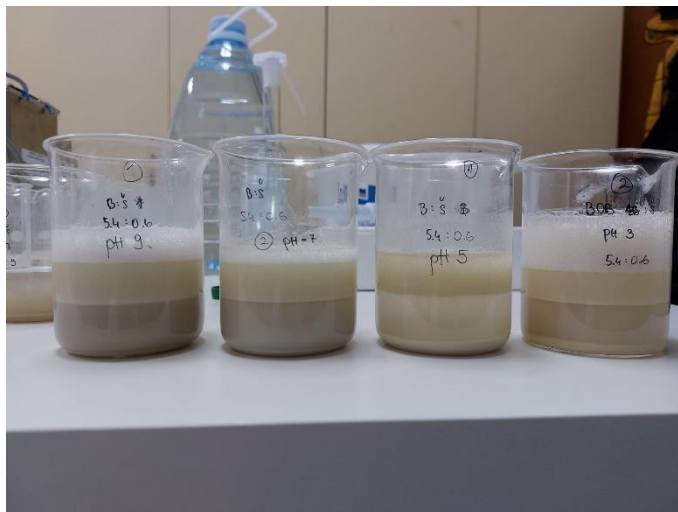
Slika 3. Usporedba vrijednosti apsorbancija izmjerenih u vremenskom razmaku od 10 minuta



Slika 4. Usporedba vrijednosti mutnoća izmjerenih u vremenskom razmaku od 10 minuta

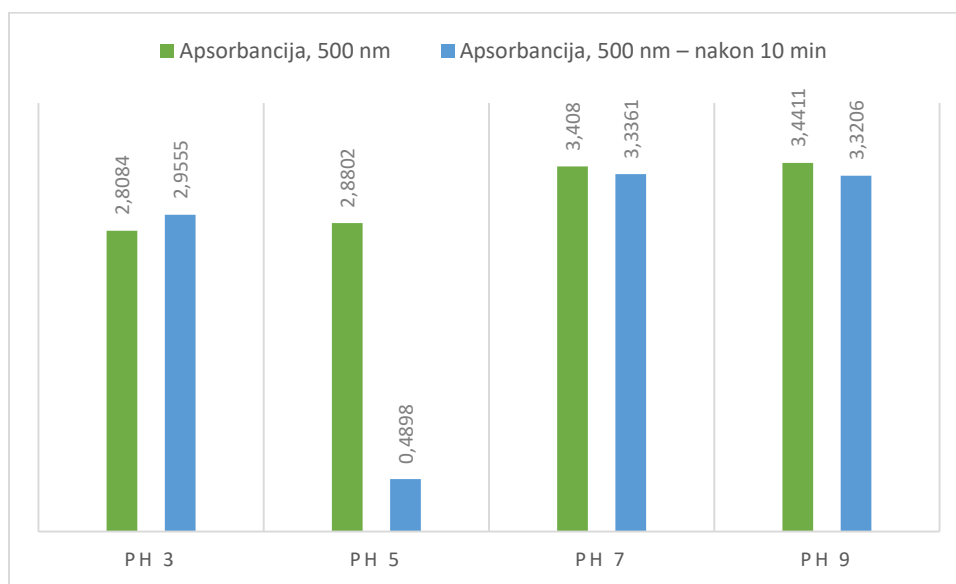


Slika 5. Usporedba vrijednosti indeksa aktiviteta emulzije izmjerenih u razmaku od 10 minuta

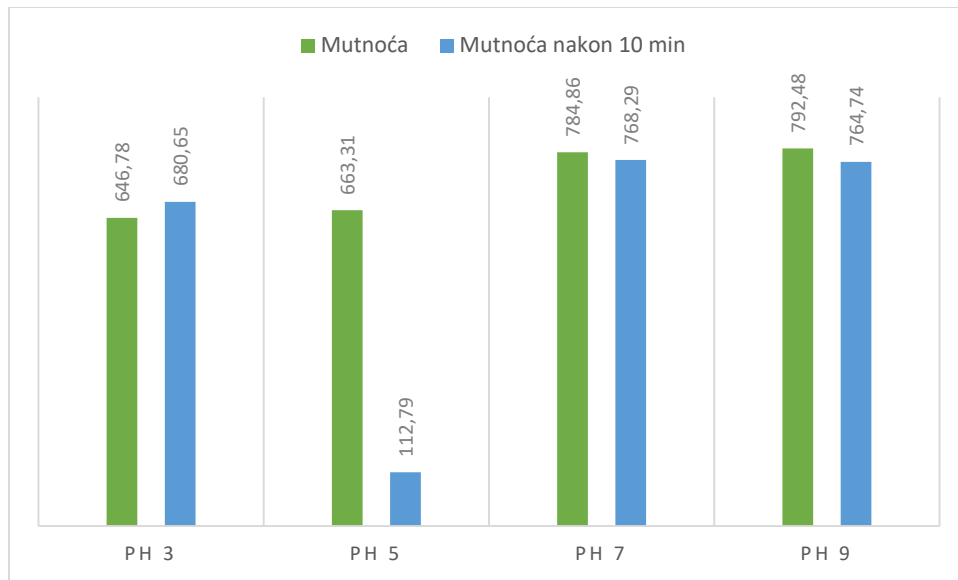


Slika 6. Izgledi emulzija pri različitim pH vrijednostima kod omjera proteina i škroba 90:10 (Vlastita fotografija)

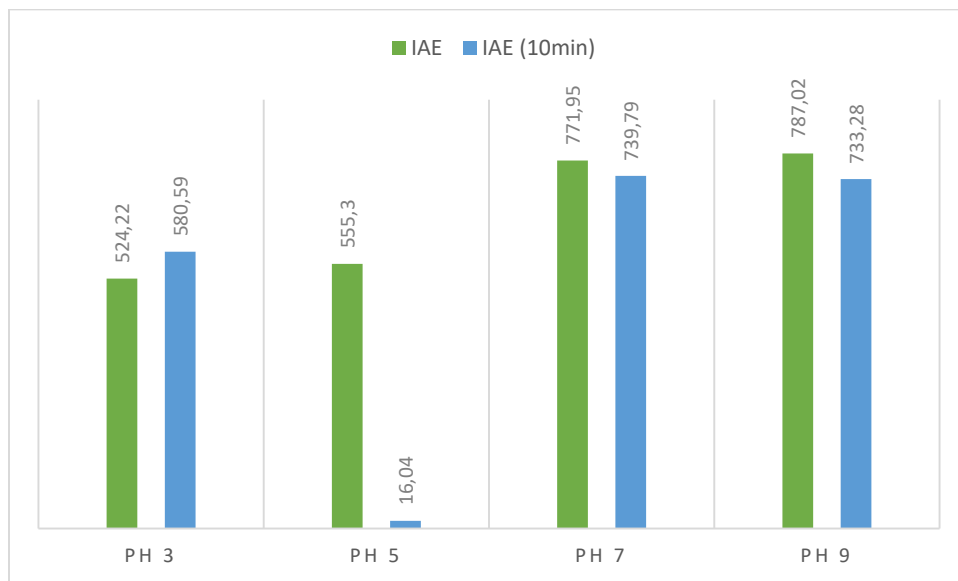
4.2.2. Omjer proteini:škrob = 70:30



Slika 7. Usporedba vrijednosti apsorbancija izmjerenih u vremenskom razmaku od 10 minuta



Slika 8. Usporedba vrijednosti mutnoća izmjerenih u vremenskom razmaku od 10 minuta

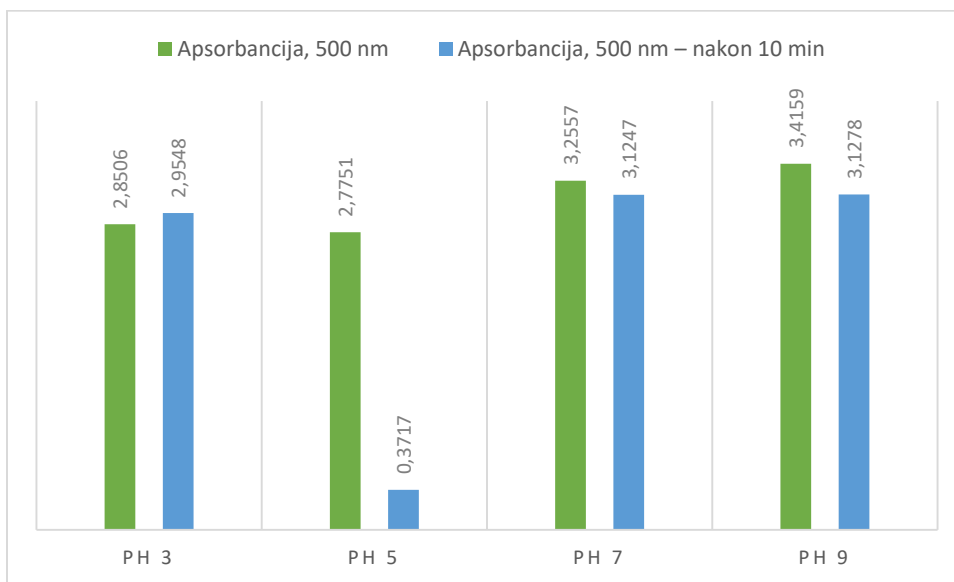


Slika 9. Usporedba vrijednosti indeksa aktiviteta emulzije izmjerenih u vremenskom razmaku od 10 minuta

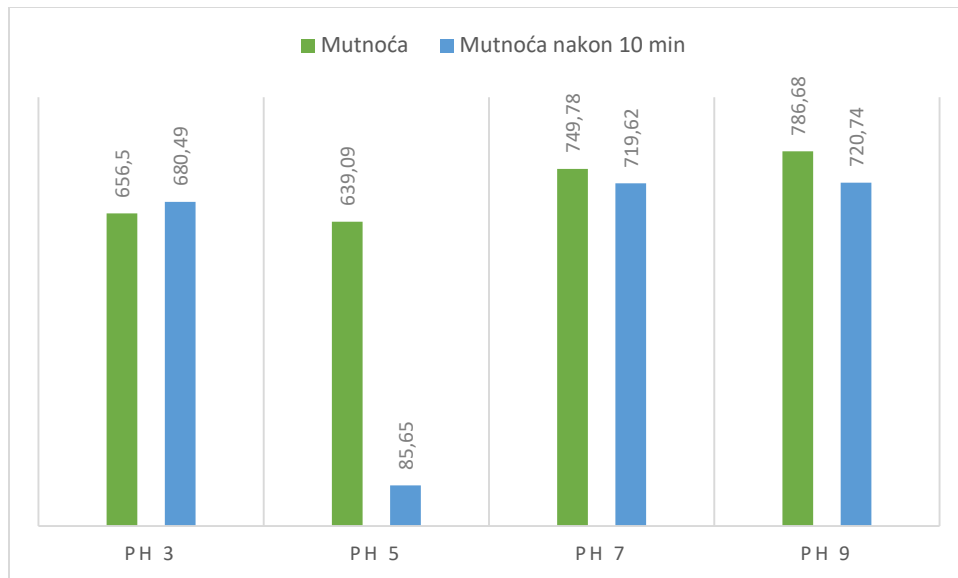


Slika 10. Izgledi emulzija pri različitim pH vrijednostima kod omjera proteina i škroba 70:30 (Vlastita fotografija)

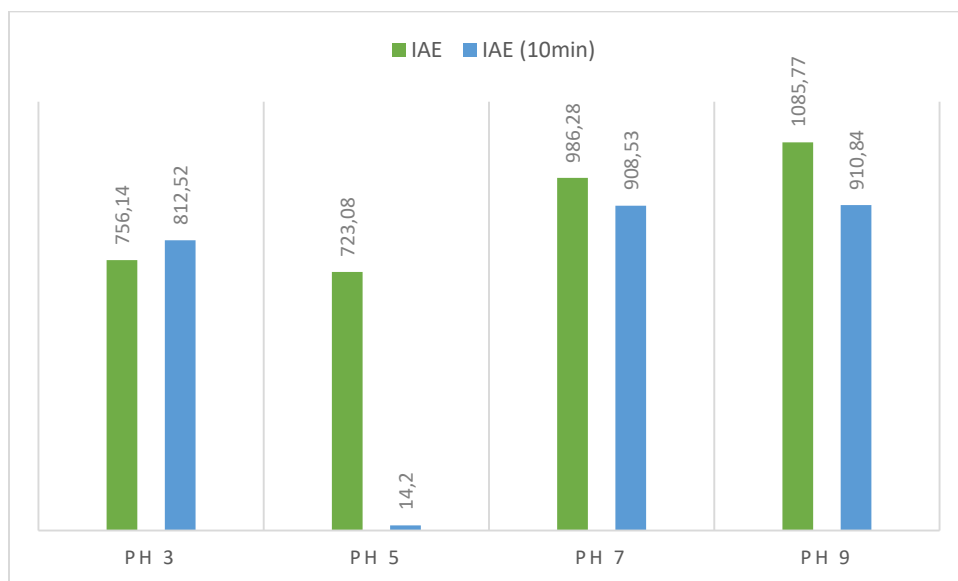
4.2.3. Omjer proteini:škrob = 50:50



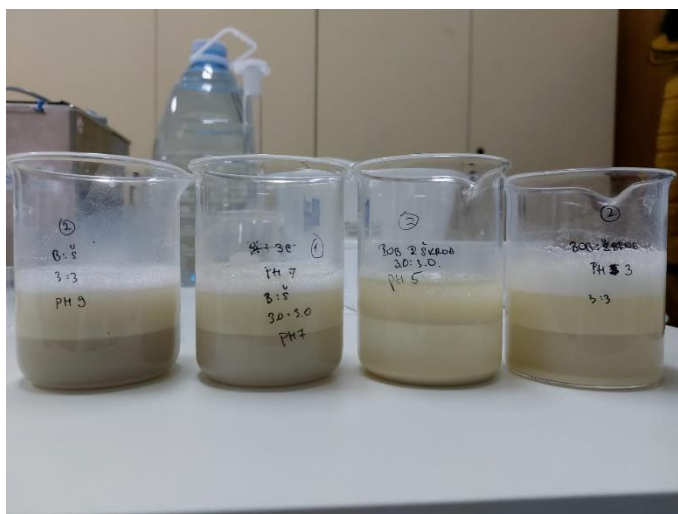
Slika 11. Usporedba vrijednosti apsorbancija izmjerenih u vremenskom razmaku od 10 minuta



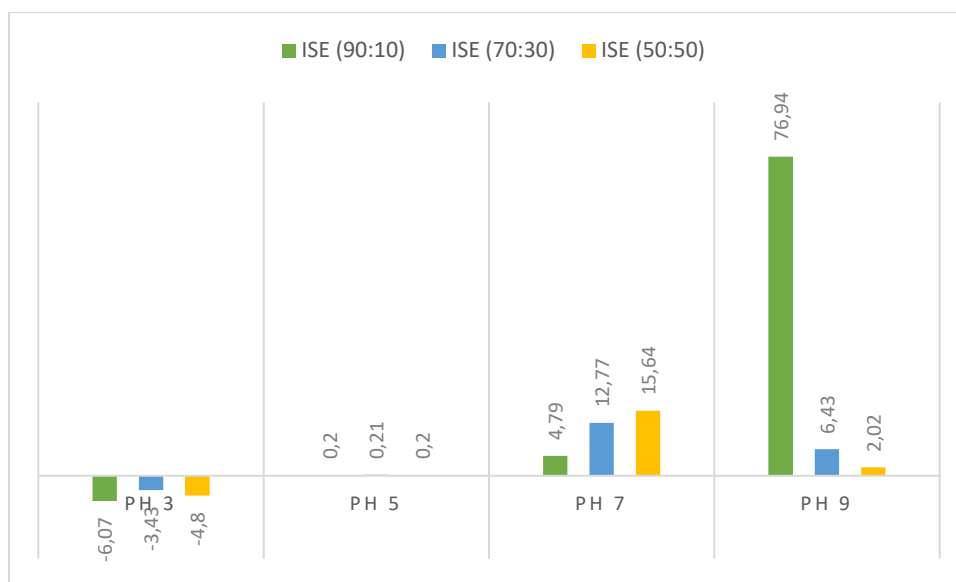
Slika 12. Usporedba vrijednosti mutnoća izmjerenih u vremenskom razmaku od 10 minuta



Slika 13. Usporedba vrijednosti indeksa aktiviteta emulzije izmjerenih u vremenskom razmaku od 10 minuta



Slika 14. Izgledi emulzija pri različitim pH vrijednostima kod omjera proteina i škroba 50:50 (Vlastita fotografija)



Slika 15. Usporedba utjecaja različitih koncentracija škroba na indeks stabilnosti emulzija

Svojstva emulgiranja proteina određuju se mjerenjem apsorbancije emulzija na UV/VIS spektrofotometru na 500 nm. Na temelju dobivenih rezultata izračuna se mutnoća dobivenih emulzija. Indeks aktiviteta emulzije (IAE) predstavlja sposobnost proteina da sprječavaju

flokulaciju i ponovno povezivanje čestica ulja brзом adsorpcijom na granici ulje/voda, a indeks stabilnosti emulzije (ISE) predstavlja sposobnost proteina da u nekom vremenskom periodu održavaju stabilnu emulziju (Lam i Nickerson, 2014).

Kapacitet emulgiranja i stabilnost emulzije ovise o svojstvima samih proteina, ali i o uvjetima emulgiranja, temperaturi, ionskoj jakosti te o pH vrijednosti. U istraživanju koje je proveo Zayas (1997) zabilježena je korelacija između topljivosti proteina, utjecaja pH i sposobnosti stvaranja emulzije. Najmanja sposobnost stvaranja emulzija zabilježena je u izoelektričnom području proteina jer kod izoelektrične točke dolazi do smanjenog odbijanja koje se događa između kapljica masti te dolazi do destabilizacije emulzije i stvaranja flokula (Zayas, 1997).

Čista amiloza i amilopektin nemaju nabijene skupine i neutralne su makromolekule. Podešavanje suspenzija čiste amiloze ili amilopektina na vrlo niske ili vrlo visoke pH vrijednosti uzrokuje dehidraciju i enolizaciju hidroksilnih skupina glukoze, čime makromolekule poprimaju negativan naboj. Dahle (1971) je proveo sustavnu studiju interakcija proteina hrane i škroba koristeći sustav proteina i škroba pšenice. Dahle je odredio vezanje protein-škrob mjerenjem škroba preostalog u otopini nakon taloženja kompleksa protein-škrob. Istraživao je učinak pH na sposobnost proteina da ulaze u interakcije sa škrobom. Maksimalna interakcija proteina i škroba dogodila se pri pH 6,5. Vezanje je bilo nešto slabije od maksimuma u kiselom području pri pH 6,5, ali mnogo slabije od maksimuma u alkalnom području. Ovi rezultati, ovisnosti vezanja o pH mogu se objasniti činjenicom da su protein i škrob koloidi suprotnog naboja pri kiselom pH. Pri alkalnijem pH, protein postaje manje pozitivno nabijen i manje je vjerojatno da će stvoriti kompleks s negativno nabijenim škrobom.

U suspenziji, - škrob i proteini boba mogu stupati u različite: vodikove veze (prisustvo vodika i elektronegativnih atoma sa slobodnim elektronskim parom), slabe Van der Waalove sile (interakcija električnih dipola) i ionske veze (povezivanje pozitivno i negativno nabijenih molekula). Molekule škroba postaju negativno nabijene udaljavajući se od svoje izoelektrične točke dok molekule proteina mogu biti i pozitivno i negativno nabijene ovisno o pH vrijednosti suspenzije u kojoj se nalaze. Izoelektrična točka proteina boba iznosi oko 5 i kod te pH vrijednosti netto naboj molekule iznosi 0. Pri pH vrijednostima iznad izoelektrične točke protein postaje negativno nabijen dok kod pH vrijednosti ispod izoelektrične točke protein ima više pozitivnog naboja (Dahle, 1971).

U rezultatima je vidljivo kako je pri pH 5 kod sva tri omjera proteina i škroba (90:10, 70:30, 50:50) najniža vrijednost indeksa aktiviteta emulzije nakon 10 minuta ($ISE_{90:10}=12,92$, $ISE_{70:30}=16,04$, $ISE_{50:50}=14,20$) što je u skladu s rezultatima dobivenim određivanjem topljivosti proteina. Također, pri pH 5 su mutnoće kod sva tri omjera najmanje nakon 10 minuta ($M_{90:10}=108,30$; $M_{70:30}=112,79$; $M_{50:50}=85,65$), a samim time su i indeksi stabilnosti emulzija za pH vrlo niski ($ISE_{90:10}=0,20$; $ISE_{70:30}=0,21$; $ISE_{50:50}=0,20$). Takvi rezultati su bili očekivani već pri samom provođenju eksperimenta jer su se na pH 5 već nakon nekoliko minuta slojevi ulja i vode odvojili. Kod pH 3 su nakon 10 minuta izmjerene veće apsorbancije odnosno veće mutnoće emulzija nego prilikom prvog mjerenja te su zbog toga vrijednosti indeksa stabilnosti emulzije negativne.

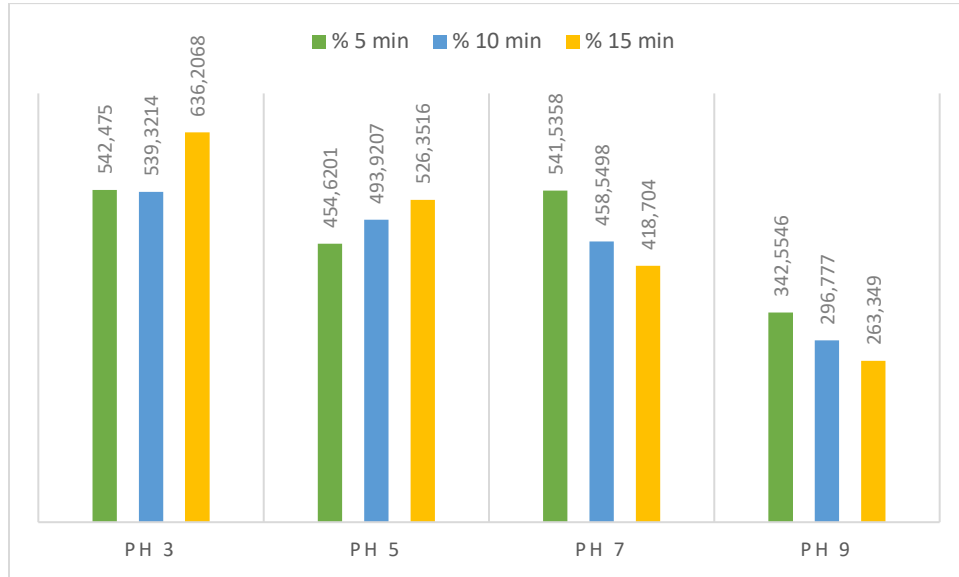
U paralelno provedenom istraživanju, izmjerene mutnoće emulzija nakon 10 minuta bile su puno niže od prvotno izmjerenih mutnoća, a dobivene emulzije su se razdvojile te su samim time i indeksi stabilnosti emulzija bili niski. U rezultatima je vidljivo da dodatak škroba utječe na stabilnost emulzija, odnosno djeluje kao stabilizator osim pri pH 5 gdje je taloženje proteina preveliko. Kod omjera proteina i škroba 90:10, najveća prvotna mutnoća emulzije izmjerena je pri pH 7 (859,13) te kod pH 9 (851,85) nakon čega slijede pH 5 (792,01) te pH 3 (702,27). Nakon 10 minuta, najveća mutnoća zabilježena je kod pH 9 (839,20) te kod pH 7 (828,62), a najmanja kod pH 5 (108,30), dok je kod pH 3 mutnoća nakon 10 minuta (755,76) bila veća nego prvotna mutnoća (702,27). Iz tog je razloga indeks stabilnosti emulzije pri pH 3 negativan (-6,07). Najveći indeks stabilnosti emulzije za omjer 90:10 izračunat je pri pH 9 (76,94), a najmanji (ne računajući negativan rezultat kod pH 3) kod pH 5 (0,20). Kod omjera proteina i škroba 70:30, najveća izmjerena početna mutnoća bila je kod pH 9 (792,48) te kod pH 7 (784,86) nakon čega slijede pH 5 (663,31) te pH 3 (646,78). Nakon 10 minuta, najveća mutnoća izmjerena je kod pH 7 (768,29) te kod pH 9 (764,74) dok je kod pH 3 mutnoća nakon 10 minuta (680,65) ponovo bila veća nego početna mutnoća (646,78). Najmanja mutnoća nakon 10 minuta izmjerena je kod pH 5 (112,79). Zbog manje početne mutnoće u odnosu na onu nakon 10 minuta, indeks stabilnosti emulzije pri pH 3 ponovo ima negativan predznak (-3,43). Najveći indeks stabilnosti emulzija je imala pri pH 7 (12,77), a najmanji ponovo pri pH 5 (0,21). Kod omjera proteina i škroba 50:50, najveća izmjerena početna mutnoća bila je kod pH 9 (786,68), a najmanja kod pH 3 (656,50). Nakon 10 minuta, najveća mutnoća izmjerena je također kod pH 9 (720,74), a najmanja kod pH 5 (86,65),

dok je kod pH 3 mutnoća nakon 10 minuta (680,49) ponovo viša nego početna mutnoća (656,50) te je ponovo indeks stabilnosti emulzije za pH 3 negativan (-4,80). Najveći indeks stabilnosti emulzija je imala pri pH 7 (15,64), a najmanji ponovo kod pH 5 (0,20). Najveća svukupna mutnoća izmjerena je kod pH 7 za omjer proteina i škroba 90:10 (859,13), a najveći indeks stabilnosti emulzije zabilježen je kod pH 9 za omjer 90:10 (76,94), dok su veće koncentracije škroba (70:30; 50:50) bolje učinke na stabilizaciju emulzija imale pri pH 7 (12,77; 15,64).

Kod najmanje koncentracije škroba (omjer proteina i škroba 90:10) najveći indeks stabilnosti emulzije bio je pri pH 9. Razlog tome je velika udaljenost te pH vrijednosti od izoelektrične točke proteina pri čemu mala količina dodanog škroba nema gotovo nikakav utjecaj na stabiliziranje, odnosno destabiliziranje emulzije i slabe su interakcije između škroba i proteina. U istraživanju koje je proveo Dahle pri pH vrijednosti 6,5 uočene su najjače interakcije između proteina i škroba. Povećanjem koncentracije škroba (omjeri proteina i škroba 70:30 i 50:50) najveći indeks stabilnosti bio je kod pH vrijednosti 7 koja nije daleka od 6,5 i kod koje su i dalje interakcije škroba i proteina jake. Kod većih koncentracija škroba smanjio se indeks stabilnosti kod pH 9 u usporedbi s manjom koncentracijom dodanog škroba u suspenziju (omjer proteina i škroba 90:10) kod koje je indeks stabilnosti emulzija bio najveći.

4.3. KAPACITET I STABILNOST PJENJENJA

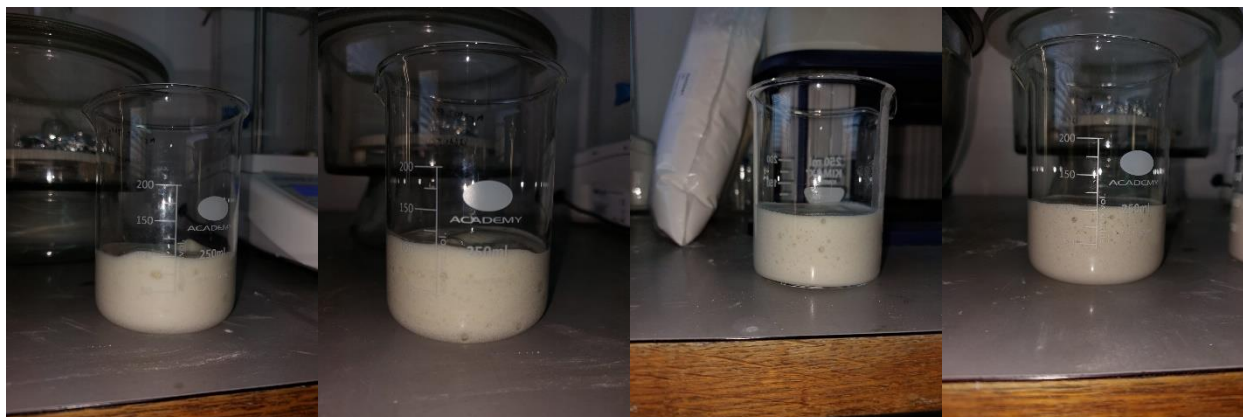
4.3.1. Omjer proteini:škrob = 90:10



Slika 16. Prikaz postotka povećanja volumena pjene pri različitim pH vrijednostima te pri različitim vremenima miksiranja

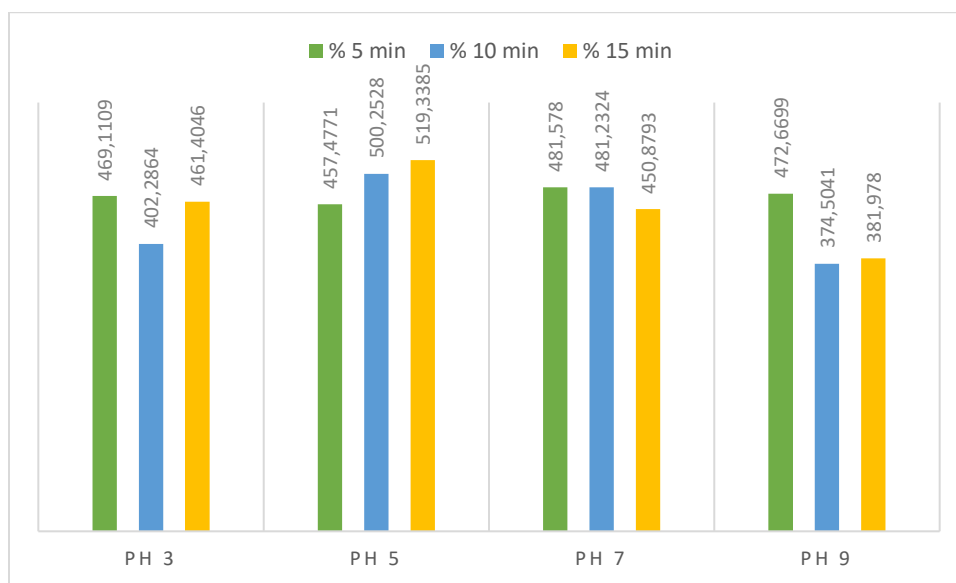
Tablica 2: Stabilnost pjene kod omjera proteina i škroba 90:10

	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
M_t	10,0184 g	17,7217 g	19,4840 g	28,1684 g
Indeks stabilnosti	40"	20"	2,5"	5,5"
Minimalna stabilnost	45'	5'	13'	5'



a) b) c) d)
Slika 17. Usporedba izgleda pjena nakon 15 minuta miješanja pri a) pH 3, b) pH 5, c) pH 7 i d) pH 9 (Vlastite fotografije)

4.3.2. Omjer proteini:škrob = 70:30



Slika 18. Prikaz postotka povećanja volumena pjene pri različitim pH vrijednostima te pri različitim vremenima miksiranja

Tablica 3: Stabilnost pjene kod omjera proteina i škroba 70:30

	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
M_t	12,2980 g	16,2333 g	18,5660 g	20,7857 g
Indeks stabilnosti	35,5"	1"	2"	8"
Minimalna stabilnost	38'	4'35"	15'	9'25"



a)

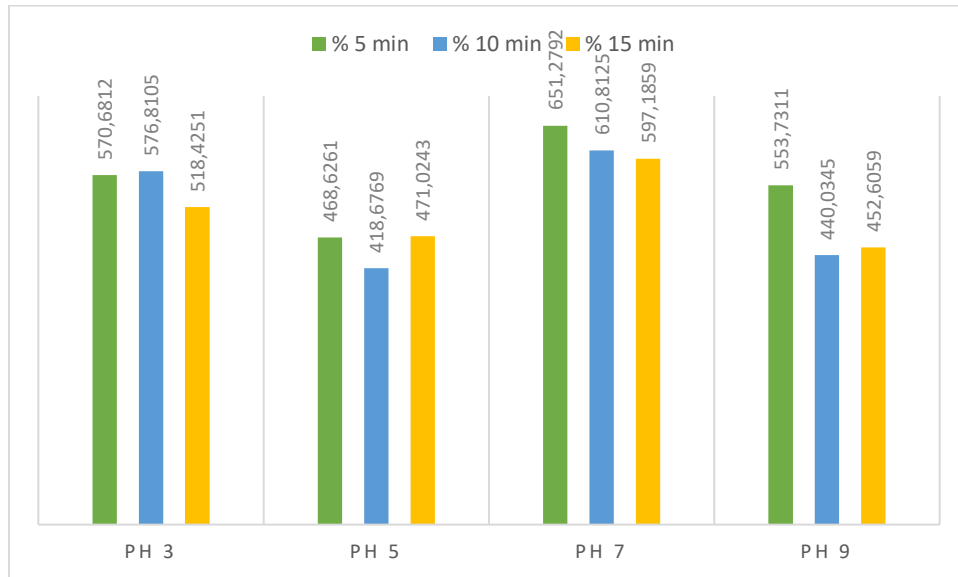
b)

c)

d)

Slika 19. Usporedba izgleda pjena nakon 15 minuta miksiranja pri a) pH 3, b) pH 5, c) pH 7 i d) pH 9 (Vlastite fotografije)

4.3.3. Omjer proteini:škrob = 50:50



Slika 20. Prikaz postotka povećanja volumena pjene pri različitim pH vrijednostima te pri različitim vremenima miksiranja

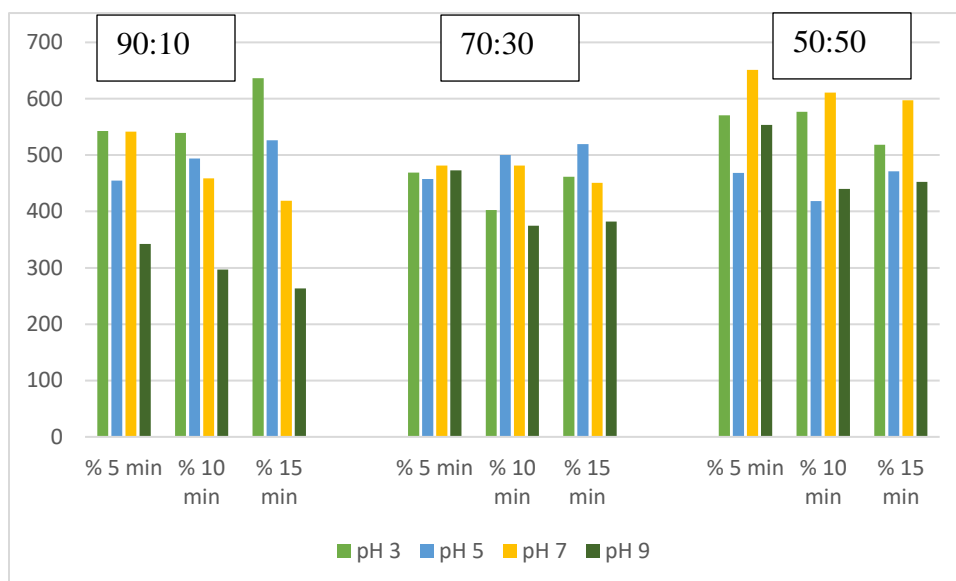
Tablica 4: Stabilnost pjene kod omjera proteina i škroba 50:50

	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
M_t	16,6024 g	14,4095 g	15,1200 g	18,7081 g
Indeks stabilnosti	0,5"	0,5"	11"	11"
Minimalna stabilnost	15'	18'	23,5'	15'



a) b) c) d)

Slika 21. Usporedba izgleda pjena nakon 15 minuta miksiranja pri a) pH 3, b) pH 5, c) pH 7 i d) pH 9 (Vlastite fotografije)



Slika 22. Usporedba utjecaja različitih koncentracija škroba na postotak povećanja volumena pjene

Sposobnost pjenjenja ovisi o mogućnosti proteinskih lanaca da se razmotaju i usmjere na međupovršinu tekućina/zrak (Amagliani i sur., 2017). Konformacijskim promjenama na proteinima dolazi do većeg izlaganja hidrofobnih dijelova molekula. Time dolazi do povezivanja proteinskih lanaca i stvaranja kontinuiranog kohezivnog filma oko mjehurića zraka. pH okoline i ovdje igra veliku ulogu. U izoelektričnoj je točki elektrostatsko privlačenje između proteina najveće. Zbog toga dolazi do smanjenja međufazne napetosti zbog većeg apsorbiranja proteina na

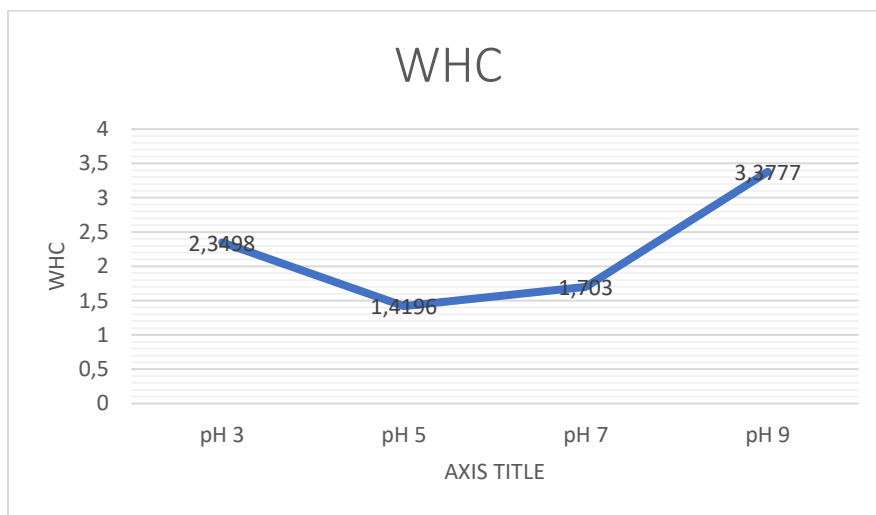
površinu pa su takvi filmovi najdeblji i imaju najveću elastičnost. Osim toga, kod te je pH vrijednosti najmanje odbijanje između molekula proteina što omogućuje lakše adsorbiranje proteina na granici. Iz tog je razloga stabilnost pjene najviša u izoelektričnom području (Zayas, 1997). Time potvrđujemo rezultate dobivene ovom analizom gdje je najmanja sposobnost pjenjenja te najmanja stabilnost pjene zabilježena pri pH 9 gdje su protein-protein interakcije na najmanjoj razini, a dominiraju protein-voda interakcije.

Kod omjera proteina i škroba 90:10, najveći postotak povećanja pjene nakon 5 minuta zabilježen je kod pH 3 (542,4750 %) te pH 7 (541,5358 %), a najmanji kod pH 9 (342,5546 %). Nakon 10 minuta miksiranja došlo je do smanjenja volumena pjene kod svih pH vrijednosti, osim kod pH 5 (454,6201 %; 493,9207 %). Nakon 15 minuta miksiranja, najveći zabilježeni postotak povećanja volumena pjene bio je pri pH 3 (636,2068 %), a najmanji pri pH 9 (263,3490 %). Također, kod pH 3 i pH 5 je nakon 15 minuta miksiranja došlo do porasta postotka povećanja volumena pjene, dok su postoci izmjereni kod pH 7 i pH 9 manji nego nakon 10 minuta. Najveći izmjereni indeks stabilnosti imala je otopina sa pH 3 (40"), a najmanji otopina sa pH 7 (2,5"). Kod omjera proteina i škroba 70:30, nakon 5 minuta miksiranja najveći postotak povećanja volumena pjene zabilježen je kod pH 7 (481,5780 %), a najmanji kod pH 5 (457,4771 %). Iz Slike 18 vidljivo je da su nakon 5 minuta miksiranja postoci povećanja volumena pjene otopina podjednaki što se može pripisati nešto većoj koncentraciji dodanog škroba. Nakon 10 minuta pri pH 5 dolazi do porasta postotka povećanja volumena pjene (500,2528 %), dok sve ostale vrijednosti padaju. Najmanji postotak povećanja volumena pjene nakon 10 minuta miksiranja zabilježen je kod pH 9 (374,5041 %). Nakon 15 minuta miksiranja, postotak povećanja volumena pjene pri pH 5 nastavlja rasti (519,3358 %), a dolazi i do porasta vrijednosti kod pH 3 (461,4046 %) te pH 9 (381,9780 %), dok postotak povećanja volumena pjene pri pH 7 konstantno pada (450,8793 %). Najveći indeks stabilnosti pjene zabilježen je kod pH 3 (35,5"), a najmanji kod pH 5 (1"). Kod omjera proteina i škroba 50:50, najveći sveukupni postotak povećanja pjene zabilježen je kod pH 7 (5 min: 651,2790 %, 10 min: 610,8125 %, 15 min: 597,1859 %) te je u blagom padu nakon svakih 5 minuta miksiranja. Pri pH 5 i 9 nakon 10 minuta vidljiv je pad postotka povećanja pjene u odnosu na prvo mjerenje te ponovni rast nakon 15 minuta miksiranja, dok je kod pH 3 najveći zabilježeni postotak povećanja pjene zabilježen nakon 10 minuta miksiranja (576,8105 %). Pri pH 7 i pH 9 zabilježeni su najveći indeksi stabilnosti (11"), dok su indeksi stabilnosti za pH 3 i pH 5 vrlo niski (0,5"). Usporedivši sva tri omjera proteina i škroba, najveći sveukupni postotak povećanja pjene zabilježen je pri pH 7 za

omjer 50:50 nakon 5 minuta miksiranja (651,2790 %). Pri toj pH vrijednosti suspenzije interakcije između proteina i škroba su najjače (Dahle, 1971) te zrak koji ostaje zarobljen unutar mjehurića suspenzije proteina i škroba teško difundira iz suspenzije čineći pjenu stabilnom. Kod manjih omjera proteina i škroba (90:10) veća stabilnost pjene uočena je bliže vrijednosti izoelektrične točke proteina jer su kod te vrijednosti najjače protein-protein interakcije i najjače je vezanje plina unutar protein-protein kompleksa čime se stabilnost i stvaranje pjene povećaju.

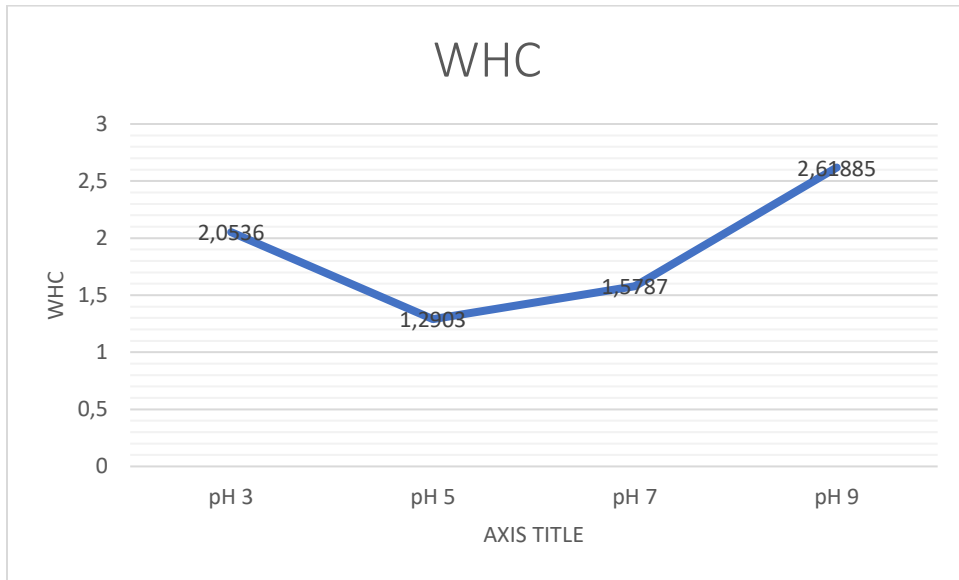
4.4. ODREĐIVANJE KAPACITETA VEZANJA VODE

4.4.1. Omjer proteini:škrob = 90:10



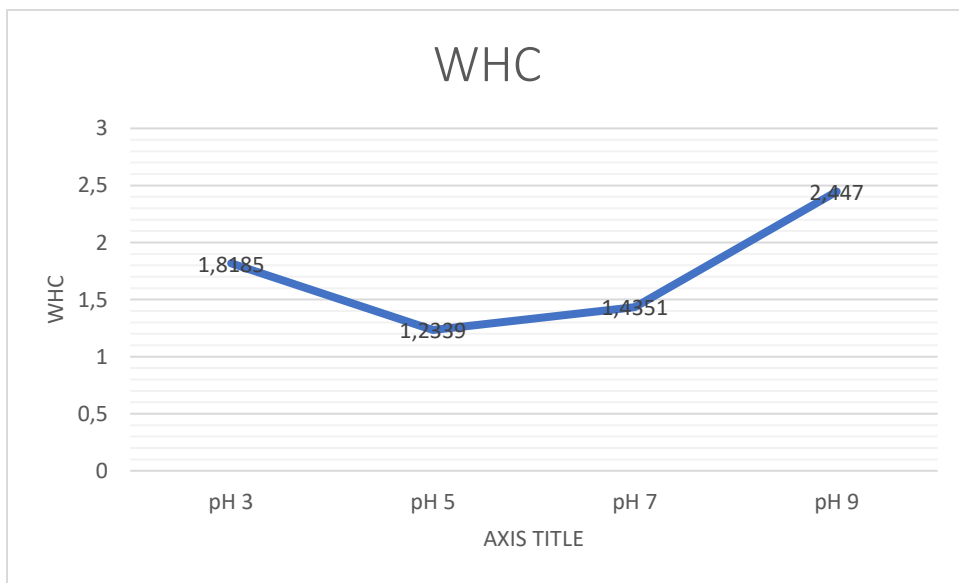
Slika 23. Sposobnost vezanja vode pri različitim pH vrijednostima kod odnosa proteina i škroba 90:10

4.4.2. Omjer proteini:škrob = 70:30

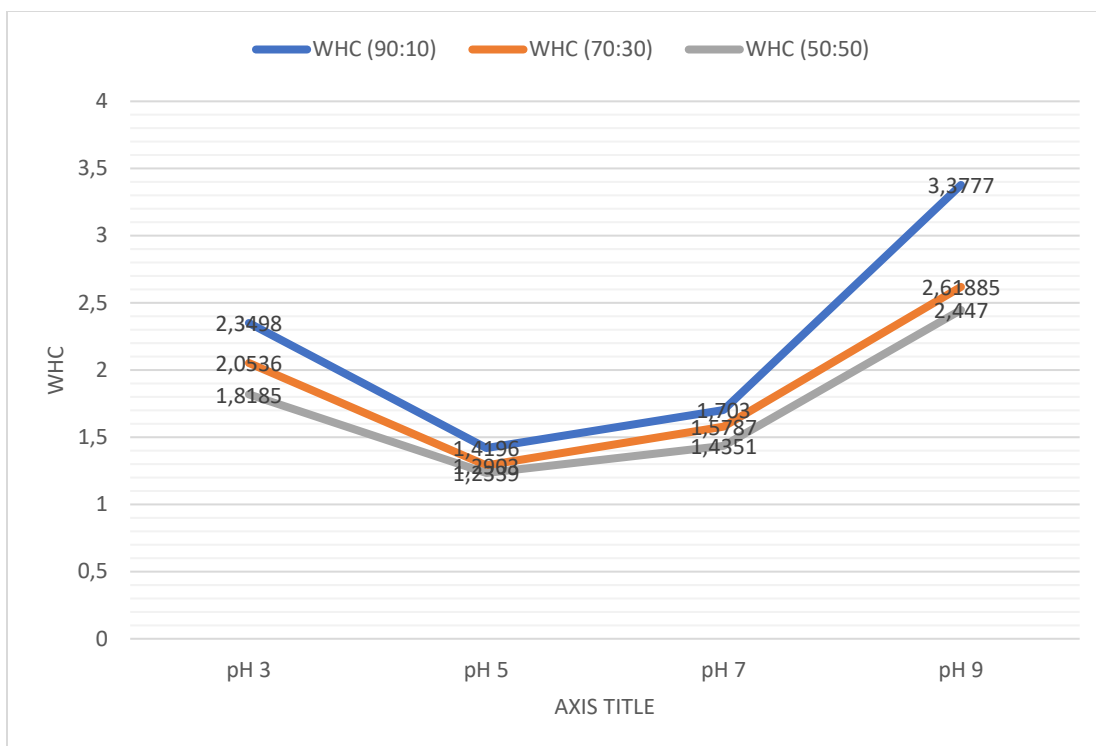


Slika 24. Sposobnost vezanja vode pri različitim pH vrijednostima kod odnosa proteina i škroba 70:30

4.4.3. Omjer proteini:škrob = 50:50



Slika 25. Sposobnost vezanja vode pri različitim pH vrijednostima kod odnosa proteina i škroba 70:30



Slika 26. Usporedba sposobnosti vezanja vode pri različitim pH te pri različitim omjerima proteina i škroba

Sposobnost vezanja vode opisuje se kao sposobnost neke tvari da zadrži vlastitu, ali i dodanu vodu tijekom centrifuge, zagrijavanja, prešanja ili neke druge tehnološke operacije. Ono ima važnu ulogu prilikom formiranja teksture hrane te je jedno od važnijih fizikalnih svojstava hrane. Sposobnost vezanja vode ovisi o protein-voda te protein-protein interakcijama. Što su protein-voda interakcije jače, manje će biti otpuštanje vode iz takvog proizvoda. pH vrijednost također ima veliki utjecaj na sposobnost vezanja vode. Naime, u izoelektričnom su području protein-voda interakcije najslabije, odnosno dominiraju protein-protein interakcije te će u tom pH području sposobnost proteina da vežu vodu biti najmanja. Promjenom pH dolazi do rastvaranja ili zatvaranja molekule proteina čime se mjesta za vezanje vode otkrivaju odnosno sakrivaju. Dakle, što je pH okoline dalji od izoelektričnog područja, to će sposobnost proteina da vežu vodu biti veća. To je vidljivo i u dobivenim rezultatima: najveća sposobnost vezanja vode (WHC) je pri pH 9 ($WHC_{90:10}=3,3777$, $WHC_{70:30}=2,61885$, $WHC_{50:50}=2,4470$), a najmanja pri pH 5 ($WHC_{90:10}=1,4196$, $WHC_{90:10}=1,2903$, $WHC_{90:10}=1,2339$). Također, na Grafu 19 vidljivo je da veća koncentracija škroba smanjuje sposobnost proteina da vežu vodu. Dakle, škrob ne mijenja

spodobnost proteina da vežu vodu pri različitim pH vrijednostima, već umanjuje sveukupnu sposobnost proteina da vežu vodu (Zayas, 1997).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Topljivost proteina u velikoj mjeri ovisi o pH suspenzije u kojoj se nalaze zbog utjecaja pH vrijednosti na površinski naboj molekule proteina te na jačinu protei-protein, odnosno protein-voda interakcija. Iz rezultata je vidljivo da je najveća topljivost proteina pri pH 3 ($c= 0,0704$ mg/mL; $A= 0,313$), a najmanja pri pH 5 ($c= 0,02235$ mg/mL; $A= 0,175$) zbog jakih protein-protein interakcija u blizini izoelektrične točke.
2. Indeks stabilnosti emulzije (ISE) predstavlja sposobnost proteina da u određenom vremenskom periodu održe stabilnu emulziju. Najveći indeks stabilnosti emulzije zabilježen je pri pH 9 kod omjera proteina i škroba 90:10 (76,94), pri istom omjeru kod pH 7 ISE iznosi 4,79, a kod pH 5 ISE iznosi 0,20. Kod ostala 2 omjera proteina i škroba (70:30 i 50:50) veća koncentracija škroba pokazala se kao dobra za stabilizaciju emulzija kod pH 7 (12,77; 15,64). Iz rezultata je vidljivo da veća koncentracija škroba ima pozitivan učinak na stabilnost emulzije čija je pH vrijednost bliska izoelektričnoj točki proteina. Udaljavajući se od vrijednosti izoelektrične točke, stabilnost emulzija bila je veća kod manjih koncentracija škroba u kombinaciji sa izolatom.
3. Sposobnost stvaranje pjene i stabilnost pjene bolje su što su protein-protein interakcije jače, a protein-voda interakcije slabije, odnosno u blizini izoelektrične točke. Iz rezultata je vidljivo da je dodatak veće količine škroba (omjer proteini škrob 50:50) u otopinu imao bolji učinak na postotke povećanja volumena pjene pri svim pH vrijednostima jer su gotovo sve vrijednosti u porastu u odnosu na vrijednosti dobivene za omjer 90:10. S druge pak strane, što je koncentracija škroba bila veća, to su indeksi stabilnosti bili niži, odnosno škrob narušava stabilnost pjene. Veća količina škroba (omjer proteini škrob 50:50) proporcionalna je postotku povećanja volumena pjene, a obrnuto proporcionalna indeksu stabilnosti pjene.
4. Sposobnost vezanja vode ovisi o protein-protein i protein-voda interakcijama. U izoelektričnom području, gdje su protein-voda interakcije najslabije, sposobnost proteina da vežu vodu bila je najmanja. Iz rezultata je vidljivo da dodatak škroba ne mijenja sposobnost proteina da vežu vodu pri određenom pH, npr. ne poboljšava vezanje vode pri

pH 5. Dodatak većih koncentracija škroba (omjeri 70:30 te 50:50) umanjuje sveukupnu sposobnost proteina da vežu vodu.

6. LITERATURA

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

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.008>

Anonymus (2020) LIS- Legume Information System.

<https://legacy.legumeinfo.org/organism/Vicia/faba>. Pristupljeno 27. kolovoza 2022.

Awuchi CG, Igwe VS, Echeta CK (2019) The Functional Properties of Foods and Flours. *Int J Adv Acad* **5** (11), 139-160.

Cardador-Martínez A, Maya-Ocaña K, Ortiz-Moreno A, Herrera Cabrera BE, Dávila-Ortiz G, Múzquiz M, Martín-Pedrosa M i sur., (2012) Effect of roasting and boiling on the content of vicine, convicine and L-3, 4-dihydroxyphenylalanine in *Vicia faba* L. *J Food Qual*, **35**(6), 419–428.

Carmo CS, Knutsen SH, Malizia G, Dessev T, Geny A, Zobel H, Myhrer K, Varela P, Sahlstrøm S (2021) Meat analogues from a faba bean concentrate can be generated by high moisture extrusion. *Future Foods*, **4**, 100014.

Cherry JP, McWatters KH (1981) Whippability and aeration, U: Cherry P (ured.) In Protein Functionality in Foods, 1.izd., ACS Symposium Series 147, *Amer Chern Soc*, Washington, D. C.

Dahle LK (1971) Wheat protein-starch interaction. I. Some starch binding effects of wheat - flour proteins. *Cereal Chem*, **48**, 706-714.

Duke JA, (1981) Handbook of Legumes of World Economic Importance, Plenum Press, New York, str. 199–265.

FAO (2020) Crop Production and Trade Data. FAO-Food and Agriculture Organization, <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Pristupljeno 14. kolovoza 2022.

Giménez MA, González RJ, Wagner J, Torres R, Lobo MO, Samman NC (2013) Effect of extrusion conditions on physicochemical and sensorial properties of corn-broad beans (*Vicia*

faba) spaghetti type pasta. *Food Chemistry*, **136**, 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.068>

Hacıseferogullar H, Gezer I, Bahtiyarca YCHO, Menges HO (2003) Determination of some chemical and physical properties of Sakızfaba bean (*Vicia faba* L. Var. major). *J Food Eng*, **60**, 475–479. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00075-X](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00075-X)

Halling P (1981) Protein-stabilized foams and emulsions. *Crit Rev Food Sci Nutr* **15**, 155.

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

Hefni ME, Shalaby MT, Witthöft CM (2015) Folate content in faba beans (*Vicia faba* L.)—Effects of cultivar, maturity stage, industrial processing, and bioprocessing. *Food Sci Nutr*, **3**, 65–73. <https://doi.org/10.1002/fsn3.192>

Hermansson AM (1986) Water- and fat holding, U: Mitchell R, Ledward DA (ured.) In Functional Properties of Food Macromolecules, 1.izd., Elsevier *Appl Sci Pub*, London, New York, str. 273.

Hoover R, Manuel H (1996) The effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of normal maize, waxy maize, dull waxy maize and amylo maize starches. *J Cereal Sci*, **23**, 153–162.

Hoover R, Hughes T, Chung H, Liu Q (2010) Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: a review. *Int Food Res J*, **43**, 399–413.

Hoover R, Sosulski FW (1991) Composition, structure, functionality, and chemical modification of legume starches: a review. *Can J Physiol Pharmacol*, **69**, 79–92.

Hulse JH (1994) Nature, composition and utilization of food legumes. U: Muehlbauer FJ, Kaiser WJ (ured.) Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes, Kluwer Academic Publishers, New York, str. 77–97. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0798-3_3

Jane J (2006) Current understanding on starch granule structures. *J Appl Glycosci*, **53**(3), 205–213.

Jiang Z, Pulkkinen M, Wang Y, Lampi AM, Stoddard FL, Salovaara H, Piironen V, Sontag-Strohm T (2015) Faba bean flavour and technological property improvement by thermal pre-treatments. *LWT -Food Sci Techn*, **68**, 295 – 305.

Jiang ZQ, Wang J, Stoddard F, Salovaara H, Sontag-Strohm T (2020) Preparation and characterization of emulsion gels from whole faba bean flour. *Food*, **9**, 755.

<https://doi.org/10.3390/foods9060755>

Kaur A, Kaur P, Singh N, Viridi AS, Singh P, Rana JC (2013) Grains, starch and protein characteristics of rice bean grown in Indian Himalaya regions. *Int Food Res J*, **54**, 102–110.

Khalil AH, Mansour EH (1995) The effect of cooking, autoclaving and germination on the nutritional quality of fababeans. *Food Chem*, **54**, 177–182. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00024-D](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00024-D)

Khazaei H, Purves RW, Hughes J, Link W, O'Sullivan DM, Schulman AH, Björnsdotter E, Geu-Flores F, Nadzieja M, Andersen SU, Stougaard J, Vandenberg A, Stoddard FL (2019) Eliminating vicine and convicine, the main anti-nutritional factors restricting faba bean usage. *Trends Food Scie Techn*, **91**, 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.051>

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

Kinsella JE (1984) Milk proteins: Physicochemical and functional properties, *CRC Crit. Rev. Food Sci Nutr*, **21**: 197.

Kitabatake N, Doi E (1982) Surface tension and foaming of protein solutions. *J Food Sci*, **47**, 1218.

Labba ICM, Frøkiær H, Sandberg AS (2021) Nutritional and antinutritional composition of faba bean (*Vicia faba* L., var. minor) cultivars. *Int Food Res J*, **140**, 110038.

Lam RSH, Nickerson MT (2014) The effect of pH and temperature pre-treatments on the physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate. *LWT – Food Sci Techn*, **60**, 427-434. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.031>

Lešić R, Borošić J, Buturac I, Čustić M, Poljak M, Romić D (2002) Povrčarstvo, Zrinski d.d., Čakovec

Li L, Yuan TZ, Setia R, Raja RB, Zhang B, Ai Y (2019) Characteristics of pea, lentil and faba bean starches isolated from air-classified flours in comparison with commercial starches. *Food Chem*, **276**, 599–607.

Link, W., Balko, C., Stoddard, F.L., 2010. Winter hardiness in faba bean: physiology and breeding. *Field Crops Res* **115**, 287–296.

Liu C, Pei R, Heinonen M (2022) Faba bean protein: A promising plant-based emulsifier for improving physical and oxidative stabilities of oil-in-water emulsions. *Food Chem*, **369**, 130879. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130879>

Luo Y, Xie W (2012) Effect of phytase treatment on iron bioavailability in faba bean (*Vicia faba* L.) flour. *Food Chem*, **134**, 1251–1255. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.082>

Luo Y, Gu Z, Han Y, Chen Z (2008) The impact of processing on phytic acid, in vitro soluble iron and Phy/Femolar ratio of fababean (*Vicia faba* L.). *J Agric Food Chem*, **89**, 861–866.

Mínguez MI, Rubiales D (2021) Faba bean. U: Sadras VO, Calderini DF (ured.) Crop Physiology Case Histories for Major Crops, Academic Press, London, str. 452-481. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819194-1.00015-3>

Nakai S, Ho L, Helbig A, Kato A, Tung MA (1980) Relationship between hydrophobicity and emulsifying properties of some plant proteins. *Can Inst Food Sci Technol J*, **13**(1), 23.

Nakai S, Powerie WD (1981) Cereals: A Renewable Resource. U: Pomeranz Y, Munch L (ured.) Theory and Practice, *Amer Assoc Cereal Chem Symposium*, Nashville, str. 736.

Nosworthy MG, Medina G, Franczyk AJ, Neufeld J, Appah P, Utioh A, Frohlich P, House JD (2018) Effect of processing on the in vitro and in vivo protein quality of beans (*Phaseolus vulgaris* and *Vicia faba*). *Nutrients*, **10**, 671. <https://doi.org/10.3390/nu10060671>

Ouraji M, Alimi M, Motamedzadegan A, Shokoohi S (2020) Faba bean protein in reduced fat/cholesterol mayonnaise: Extraction and physico-chemical modification process. *Food Sci Techn J*, **57**, 1774–1785. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04211-9>

PGRO (2008) Pulse agronomy guide. PGRO-The Provoessors an Growers Research Organisation, http://www.pgro.org/agronomy_guide/agron_guide.shtml. Pristupljeno 14. kolovoza 2022.

Purdon AD (1980) The temperature dependence of surface tension and critical micelle concentration of egg lysolecithin, *Colloid Polym Sci*, **258**, 1062.

Rahate KA, Madhumita M, Prabhakar PK (2020) Nutritional composition, anti-nutritional factors, pre-treatments-cum-processing impact and food formulation potential of faba bean (*Vicia faba* L.): A comprehensive review. *LWT - Food Sci Techn*, **138**, 110796.

Ratnayake WS, Hoover R, Warkentin T (2002) Pea starch: composition, structure and properties—a review. *Starch-Stärke*, **54**, 217–234.

Revilla I (2015) Processing and Impact on Active Components in Food. Academic Press, London, str. 337-343. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00040-8>

Rosa-Sibakov N, Heiniö RL, Cassan D, Holopainen-Mantila U, Micard V, Lantto R, Sozer N (2016) Effect of bioprocessing and fractionation on the structural, textural and sensory properties of gluten-free faba bean pasta. *LWT- Food Sci Techn*, **67**, 27–36

Ross HA, Davies HV (1992) Sucrose metabolism in tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.): effect of sink removal and sucrose flux on sucrose degrading enzymes. *Plant Physiol*, **98**, 287–293.

Sharma A, Sehgal S (1992) Effect of processing and cooking on the antinutritional factors of faba bean (*Vicia faba*). *Food Chem*, **43**, 383–385. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(92\)90311-O](https://doi.org/10.1016/0308-8146(92)90311-O)

Singh AK, Bharati RC, Pedpati A (2013) An assessment of faba bean (*Vicia faba* L.) current status and future prospect. *Afr J Agric Res*, **8**, 6634–6641.

Sozer N, Melama L, Silbir S, Rizzello CG, Flander L, Poutanen K (2019) Lactic acid fermentation as a pre-treatment process for faba bean flour and its effect on textural, structural and nutritional properties of protein-enriched gluten-free faba bean breads. *Food*, **8**, 431. <https://doi.org/10.3390/foods8100431>

Sulaiman N, Orfila C, Ho P, Maycock J (2018) Viciafaba: A cheap and sustainable source of protein and its application in beef products. *Proc Nutr Soc*, **77** (OCE4), E137.

Tazart K, Lamacchia C, Zaidi F, Haros M (2016) Nutrient composition and in vitro digestibility of fresh pasta enriched with *Vicia faba*. *J Food Comps Anal*, **47**, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.12.007>

Tester RF, Morrison WR (1990) Swelling and gelatinization of cereal starches I. Effects of amylopectin, amylose and lipids. *Cereal Chem*, **67**, 551–559.

Toklu F, Gupta DS, Karaköy T, Özkan H (2021) Bioactives and Nutraceuticals in Food Legumes: Nutritional Perspective. U: Gupta DS, Gupta S, Kumar J (ured.) Breeding for Enhanced Nutrition and Bio-Active Compounds in Food Legumes, Springer, str. 229–245. https://doi.org/10.1007/978-3-030-59215-8_10

Tombs MP, Newsom BG, Wilding P (1974) Protein solubility: phase separation in arachin-salt-water systems. *Int. J. Pept. Res.*, **6**, 253-277. DOI: [10.1111/j.1399-3011.1974.tb02384.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1974.tb02384.x)

USDA (2021) Food Data Central (Nutrient Database). USDA-United States Department of Agriculture, <https://fdc.nal.usda.gov/>. Pristupljeno 14. kolovoza 2022.

Valente IM, Maia MR, Malushi N, Oliveira HM, Papa L, Rodrigues JA, Fonseca AJ, Cabrita AR (2018) Profiling of phenolic compounds and antioxidant properties of European varieties and cultivars of *Vicia faba* L. pods. *Phytochemistry*, **152**, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.05.011>

Walstra P (1983) In Encyclopedia of Emulsion Technology – 1. izd., (preveli Becher P), Marcel Dekker, New York, str. 57.

Wang N, Warkentin TD, Vandenberg B, Bing DJ (2014) Physicochemical properties of starches from various pea and lentil varieties, and characteristics of their noodles prepared by high temperature extrusion. *Food Res Intl*, **55**, 119–127.

Xiao JX, Zhu YA, Bai WL, Liu ZY, Li TANG, Zheng Y (2021) Yield performance and optimal nitrogen and phosphorus application rates in wheat and faba bean intercropping. *J Integr Agric*, **20**(11), 3012–3025. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63489-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63489-X)

Zayas JF (1997) *Functionality of Proteins in Food*, Springer, Verlag, Berlin, Heidelberg, str. 77-309.

Zee JA, Bourgeois M, Boudreau A, Breton R, Jones JD (1987) Use of faba beans in the manufacture of tofu. Canadian Institute of 12 of 13 DHULL ET AL. *Food Sci Techn J*, **20**, 260–266. [https://doi.org/10.1016/S0315-5463\(87\)71197-3](https://doi.org/10.1016/S0315-5463(87)71197-3)

Zhang Z, Tian X, Wang P, Jiang H, Li W (2019) Compositional, morphological, and physicochemical properties of starches from red adzuki bean, chickpea, faba bean, and baiyue bean grown in China. *Food Sci Nutr*, **7**, 2485–2494.

Zhou R, Hyldgaard B, Yu X, Rosenqvist E, Ugarte RM, Yu S i sur., (2018) Phenotyping of faba beans (*Vicia faba* L.) under cold and heat stresses using chlorophyll fluorescence. *Euphytica*, **214**, 68. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2154-y>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja LUKA PILJEK izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Luka Piljek

Vlastoručni potpis