

# Izolacija proteina iz sjemena industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.)

---

Pišonić, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

*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:159:853241>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-16**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Petra Pišonić**

7602/PT

***IZOLACIJA PROTEINA IZ SJEMENA INDUSTRIJSKE  
KONOPLJE (Cannabis sativa L.)***

ZAVRŠNI RAD

**Predmet:** Osnove prehrambene tehnologije

**Mentor:** doc. dr .sc. Marko Obranović

**Zagreb, 2021.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno - biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo**  
**Laboratorij za tehnologiju ulja i masti**

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

## ***Izolacija proteina iz sjemena industrijske konoplje***

***(Cannabis sativa L.)***

***Petra Pišonić, 0058212701***

### **Sažetak:**

Porast svjetske populacije iziskuje i veću potražnju za proteinima, a pogače dobivene nakon ekstrakcije ulja predstavljaju dobar izvor proteina. Sjeme industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) izvor je visokokvalitetnog ulja koje sadrži preporučeni omjer omega-6 i omega-3 esencijalnih masnih kiselina te je i izvor proteina bogatih esencijalnim aminokiselinama. Cilj ovoga rada bio je istražiti utjecaj predpriprema (način mljevenja, prosijavanje, tretiranje ultrazvukom visokog intenziteta) te različitih parametara kiselinsko–bazne ekstrakcije (vrijeme ekstrakcije, omjer vode i pogače, utjecaj soli i pH) na količinu i čistoću dobivenog proteinskog izolata iz nusprodukta proizvodnje konopljinog ulja - pogače. Iz dobivenih rezultata, prosijavanje se pokazalo kao značajna metoda predpripreme. Kriogenim mljevenjem dobiveno je 3,18 g izolata (12,72%) s niskim udjelom proteina (48,47%). Najbolji rezultati su dobiveni pri vremenu ekstrakcije od 60 min i omjeru pogače i deionizirane vode 1:20. Primjenom pH 12 dobiva se najviše proteinskog izolata (7,9g – 31,60%) najvećeg udjela proteina (73,38%).

**Ključne riječi:** industrijska konoplja, izolacija proteina, ulje, masne kiseline

**Rad sadrži:** 34 stranice, 12 slika, 7 tablica, 38 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u:** Knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** doc. dr. sc. Marko Obranović

**Rad predan:** 12. srpnja 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Undergraduate studies of Food Technology**

**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Oil and Fat Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Food Technology**

### **Proteins isolation from industrial hempseed**

*(Cannabis sativa L.)*

*Petra Pišonić, 0058212701*

#### **Abstract:**

The increase of world population is also increasing demand for protein, and the cakes obtained after oil extraction are a good source of protein. Industrial hemp seeds (*Cannabis sativa* L.) are source of high quality oil that contains the recommended ratio of omega-6 and omega-3 essential fatty acids and it is also source of protein, meaning they are rich with essential amino acids. The aim of this study was to investigate the influence of pre-preparations (grinding method, sieving, high-intensity ultrasound treatment) and different parameters of acid-base extraction (extraction time, water-to-cake ratio, salt and pH) on the received amount and purity of protein isolate obtained from hemp oil by-product – press cake. From the obtained results, sieving proved to be a significant method for pre-preparation. Cryogenic milling yielded 3.18 g of protein isolate (12.72%) but with a low protein content (48.47%). The best results were obtained with extraction time of 60 min and water-to-cake ratio at 1:20. Applying pH 12 gives the highest protein isolate (7.9g – 31.60%) with the highest protein content (73.38%).

**Keywords:** fatty acids, hemp, oil, protein isolation

**Thesis contains:** 34 pages, 12 figures, 7 tables, 38 references

**Original in:** Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Assistant professor Marko Obranović, PhD.

**Defence date:** July 12<sup>th</sup> 2021.

# SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1.    BILJKA KONOPLJE.....	2
2.2.    SJEME KONOPLJE .....	2
2.2.1. Ulje od sjemena konoplje .....	3
2.2.2. Proteini konoplje .....	5
2.3.    PREDTRETMANI POGAČE .....	9
2.3.1. Mljevenje.....	9
2.3.2. Prosijavanje .....	10
2.3.3. Ultrazvuk visokog intenziteta .....	10
2.3.4. Visokonaponsko električno pražnjenje (HVED) i impulsno električno polje (PEF) .	10
2.4.    METODE IZOLACIJE PROTEINA.....	11
2.4.1. Kiselinsko – bazna ekstrakcija .....	11
2.4.2. Micelizacija.....	12
2.4.3. Termičko tretiranje .....	12
2.4.4. Enzimaska hidroliza .....	12
2.4.5. Aciliranje.....	13
2.4.6. Soxhlet metoda i homogenizacija pod visokim tlakom .....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	14
3.1.    MATERIJAL.....	14
3.2.    METODE RADA .....	14
3.2.1. Određivanje udjela ulja u sjemenu i pogači konoplje .....	14
3.2.2. Određivanje sastava masnih kiselina pomoću plinske kromatografije.....	15
3.2.3. Mljevenje rotacionim mlinom i prosijavanje.....	16
3.2.4. Mljevenje kriomlinom .....	16
3.2.5. Izolacija proteina.....	16
3.2.6. Određivanje udjela proteina u sjemenu .....	19
3.2.7. Obrada rezultata .....	20

<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	21
4.1. UDIO ULJA I PROTEINA U SJEMENU I POGAČI KONOPLJE TE SASTAV MASNIH KISELINA U ULJU OD SJEMENA KONOPLJE.....	21
4.2. IZOLACIJA PROTEINA .....	24
4.2.1. Utjecaj volumena deionizirane vode i vremena miješanja na udio proteina u uzorku	24
4.2.2. Utjecaj lužnatog pH na dobiveni izolat proteina.....	27
4.2.3. Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta i otopina NaCl-a .....	28
4.2.4. Kriogeno samljevena konopljina pogača .....	30
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	31
<b>6. LITERATURA</b> .....	32

# 1. UVOD

Tradicionalna uporaba pogača dobivenih nakon prešanja ulja je u ishrani životinja ili kao organsko gorivo, međutim, u većini slučajeva ona predstavlja otpad te je u tom slučaju veliki problem ne samo za okoliš već i za proizvođača koji otpad mora adekvatno zbrinuti. Zbrinjavanje nusproizvoda prehrambene industrije, poput pogača dobivenih nakon ekstrakcije ulja, nije jednostavno zbog njihove biološke nestabilnosti, potencijalno patogene prirode, velikog sadržaja vode, potencijalno brze autooksidacije i vrlo visoke enzimske aktivnosti (Hadnađev i sur., 2018). Međutim, u današnje vrijeme zajedno s rastom populacije raste i potražnja za prehrambenim proteinima koji su većinom životinjskog porijekla. Prehrana koja sadrži više biljnih bjelančevina povećava se iz nekoliko razloga: negativni utjecaji na proizvodnju životinjskih bjelančevina u okolišu te sve veći trend vegetarijanstva i veganstva (Pojić i sur., 2018).

*Cannabis sativa* L. potječe iz Azije odakle se proširila po cijelome svijetu. U Kini se upotrebljavala kao sirovina u tekstilnoj industriji, no najviše se ipak upotrebljava u Indiji gdje se sjeme konoplje koristi kao lijek, a osušeni ženski cvjetovi kao opojna droga. U zapadnoj Europi konoplja se na većim površinama počela uzgajati radi vlakna u 15. st., a nakon otkrića Amerike širila se duž tog kontinenta (Butorac, 2021). Danas postaje sve atraktivnija kako u kozmetičkoj tako i u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji i to najviše zbog ulja dobivenog hladnim prešanjem koje je nutritivno izrazito bogato esencijalnim masnim kiselinama i tokoferolima, ali i zbog kanabionida dobivenih ekstrakcijom iz suhih cvjetova. Međutim, i pogača dobivena nakon ekstrakcije ulja je također nutritivno bogata i predstavlja dobru sirovinu za ekstrakciju proteina i to ne samo zbog svoga udjela, nego i činjenice da sadrži esencijalne aminokiseline.

Kako bi se izolirala što veća koncentracija proteina iz konopljine pogače važno je voditi računa o predpripremi te samom procesu. Razni postupci nakon izolacije koji se temelje na različitim kemijskim, fizikalnim i enzimskim modifikacijama mogu dodatno poboljšati funkcionalna svojstva proteinskih izolata u smislu topljivosti, emulgiranja i kapaciteta, stabilnosti stvaranja pjene, kao i hranjive vrijednosti, poput formiranja bioaktivnih peptida (Pojić i sur., 2018). U ovome radu planira se istražiti utjecaj predpripreme konopljine pogače kao što su: način mljevenja, prosijavanje, tretiranje ultrazvukom visokog intenziteta te utjecaj parametara kiselinsko - bazne ekstrakcije kao što su: vrijeme trajanja ekstrakcije, omjer vode i pogače, utjecaj soli i pH na sam proteinski izolat konopljine pogače.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. BILJKA KONOPLJE**

Biljka konoplje je jednogodišnja dvodomna biljka oprašivana vjetrom. Konoplja pripada porodici *Cannabaceae* i rodu *Cannabis*, ovaj rod čini jedna vrsta po imenu *sativa*, međutim postoji više njezinih varijeteta: *Cannabis sativa var. vulgaris* (obična konoplja), *Cannabis sativa var. indica Lam.* (indijska konoplja), *Cannabis sativa var. indica Lam. subvar. gigantea* (divovska konoplja) i *Cannabis sativa var. ruderalis Janisch* (divlja konoplja) (Butorac, 2021).

Konoplja se u Europi uzgaja uglavnom zbog vlakana koji su svoju primjenu pronašli u raznim industrijama primjerice proizvodnji papira, ribarskih mreži, raznih vrsta konopa, a sve zbog svoje čvrstoće, dok se manji udio konoplje uzgaja u svrhu dobivanja sjemena (proizvodnja ulja, stočna hrana). U spomenute svrhe dozvoljeno je uzgajati sorte konoplje koje su uvrštene u katalog sorti poljoprivrednih biljnih vrsta Europske unije, maksimalnog sadržaja tetrahidrokanabinola (THC), što je glavna psihoaktivna supstanca, ograničenog na 0,2% (EFSA Journal, 2011) (SL L 347, 20.12.2013.). U Republici Hrvatskoj, sukladno zadnjim izmjenama i dopunama Zakona o suzbijanju zlouporabe droga („Narodne novine“, broj 39/19.), ukinute su dozvole za uzgoj konoplje, a uvedena je obveza pravnim i fizičkim osobama koje uzgajaju industrijsku konoplju da se prije početka proizvodnje (sjetve) moraju upisati u Evidenciju proizvođača industrijske konoplje, koju vodi ministarstvo nadležno za poljoprivredu.

### **2.2. SJEME KONOPLJE**

Sjeme je duljine 2,5-3,5 mm te ima smeđu boju s tamno smeđim prugama koje se obično uklanjaju tijekom vršidbe tako da očišćene sjemenke imaju svijetlo smeđu-sivu boju (Leonard i sur., 2020). Potin i sur. (2019) u svome radu objavili su sastav sjemena konoplje prije i nakon ekstrakcije ulja, što je i prikazano u Tablici 1. Prema njihovim rezultatima, kao i u ostalim radovima udio proteina i ulja u sjemenu konoplje kreće se između 25 i 35%. Također, primijećeno je kako nakon ekstrakcije ulja u sjemenskoj pogači dominiraju vlakna te proteini koji zbog svojeg sastava imaju pozitivne učinke na zdravlje čovjeka.



Tablica 1. Komponente sjemena i konopljine pogače (Potin i sur.,2019)

Komponenta	Sjeme konoplje	Pogača konoplje
Suha tvar	94,7%	95,9%
Lipidi	30,2%	8,7%
Pepeo	5,2%	6,9%
Proteini	22,5%	30,0%
Ostalo	42,0%	54,4%

Kao negativnu komponentu sjemena konoplje Pojić i sur. (2014) navode kako konoplja sadrži neke antinutritivne čimbenike, najviše fitinsku kiselinu te inhibitore tripsina koji negativno utječu na probavni sustav čovjeka.

### 2.2.1. Ulje od sjemena konoplje

Ulje od sjemena konoplje dobiva se hladnim prešanjem sjemena na pužnim prešama i to je metoda koja se najčešće koristi, no u pojedinim znanstvenim radovima korištene su i brojne druge metode poput ultrazvuka ili mikrovalova kako bi se što više očuvao nutritivni sastav ulja, produžila njegova trajnost te kako bi se povećalo iskorištenje samog procesa. Zbog visokog udjela klorofila ulje konoplje je tamne zelene boje.

Sjeme konoplje se obično sastoji od 25 do 35% ulja, od čega 90% čine nezasićene masne kiseline. U ulju od sjemena konoplje po udjelu se ističu i neke esencijalne masne kiseline, primarno linolenska (18:2, omega-6), ali i alfa-linolenska (18:3, omega-3) kako je prikazano u Tablici 2. Esencijalne masne kiseline predstavljaju one kiseline koje ljudski organizam sam ne može sintetizirati te se one moraju unositi hranom. One su također i esencijalne za zdravlje organizma pogotovo u zaštiti od kardiovaskularnih bolesti, pretilosti, dijabetesa. Ulje sjemena konoplje savršeno je uravnoteženo s obzirom na omjer (3:1) dviju esencijalnih polinezasićenih masnih kiselina (linolne i linolenske) za ljudsku prehranu (Sacilik i sur., 2003).

Također, prema radu Callaway (2004) unos ostalih polinezasićenih masnih kiselina izrazito je važan za organizam jer su uključene u formaciju fosfolipidnog dvosloja stanične membrane što je esencijalno za održavanje vitalnih karakteristika fluidnosti stanične membrane, posebice u konstrukciji neuronskih membrana unutar središnjeg živčanog sustava. Nadalje, smatra se kako prehrana koja sadrži dovoljnu količinu polinezasićenih masnih kiselina može smanjiti arterijsku razinu LDL - kolesterola i krvni tlak kod ljudi.

Tablica 2. Prosječni udio masnih kiselina (%) konoplje i ostalih uljarica (Callaway, 2004)

Sjeme	Palmitinska kiselina	Stearinska kiselina	Oleinska kiselina	Linolenska kiselina	<i>Alfa</i> -Linolenska kiselina	% PUFA
Ulje konoplje	5	2	9	56	22	84
Konopljino vlakno	8	3	11	55	21	77
Lan	6	3	15	15	61	76
Soja	10	4	23	55	8	63
Maslina	15	0	76	8	<1	8

Isto tako, steroli su u velikim količinama prisutni u ulju sjemena konoplje, a posebno se ističe  $\beta$ -sitosterol čak 68% kojeg su u svome uzorku, odnosno istraživanju, pronašli Leonard i sur. (2020). Ono za što su fitosteroli, biljni steroli, zaslužni je regulacija kolesterola u krvi, ali pretpostavlja se kako imaju i ulogu u prevenciji obolijevanja od karcinoma, s obzirom na to da imaju protuupalna te antioksidativna svojstva, no te pretpostavke potrebno je još dodatno istražiti.

Nadalje, tokoferoli su glavna komponenta u hrani koja je zaslužna za aktivnost vitamina E. Njihova sposobnost da reagiraju i deaktiviraju slobodne radikale čini ih jakim antioksidansima, koji štite nezasićene masne kiseline od oksidacije (Leonard i sur., 2020). Prosječno se u ulju od sjemena konoplje nalazi od 80 do 90 mg tokoferola u 100 g ulja.



*Slika1. Ulje sjemena konoplje dobiveno dvostrukim hladnim prešanjem u laboratoriju za tehnologiju ulja i masti (vlastita fotografija)*

### **2.2.2. Proteini konoplje**

FAO (*Food and Agriculture Organization - Organizacija za prehranu i poljoprivredu*) procjenjuje da će zahtjev za proteinima porasti između 2010. i 2030. za 40% kao odgovor na porast populacije. Ovo povećanje procijenjeno je na 33%, odnosno 43% za životinjske i biljne proteine (Ozanne, 2014).

Sjeme konoplje sadrži oko 30% ulja i 25% proteina, dok ostalo čine prehrambena vlakna, vitamini i minerali. Ekstrakcijom ulja iz sjemena konoplje udio proteina se povećava za 10 - 15%. Aiello i sur. (2016) u svome radu utvrdili su da sjeme konoplje ukupno sadrži 181 protein, zajedno s dva najveća skladišna proteina od kojih je jedan tip legumin - edestin (67 - 75%), a drugi globularni tip - albumin (25 - 37%). Istraživanja pokazuju kako ova dva najznačajnija proteina u industrijskoj konoplji imaju, osim različitog aminokiselinskog sastava, i različita funkcionalna svojstva. Kako bi se odredila kvaliteta proteina, osim sastava aminokiselina, važno je poznavati njegovu probavljivost kao i kakva su njegova funkcionalna svojstva jer poznavanjem tih parametara konopljina pogača može se prenamijeniti te koristiti i u prehrambenoj industriji.

### **2.2.2.1. Edestin**

Kristalografska karakterizacija edestinskog dijela otkrila je šest identičnih podjedinica koje se sastoje od bazne i kisele podjedinice povezane disulfidnom vezom (Patel i sur., 1994). Kako su podjedinice povezane s čvrstom kovalentnom disulfidnom vezom tako je i sam protein slabije topiv što uvelike smanjuje njegova funkcionalna svojstva.

Malomo i Aluko (2015) u svome radu zaključili su kako je edestinska frakcija proteina konoplje nutritivno superiorna. Aminokiselinski sastav edestina sadržavao je aminokiseline s višim sadržajem sumpora (metionin i cistein), aromatične pobočne ogranke, razgranati lanac i hidrofobne aminokiseline. Analiza sastava aminokiselina ukazala je na omjer arginina i lizina koji je iznosio 4,37 što je znatno više od vrijednosti 1,74 koja je dobivena za albumin. Visok omjer arginina i lizina ukazuje na veliki potencijal globulina da se koristi kao dodatak prehrambenim proizvodima koji se koriste za održavanje zdravlja srca i krvnih žila (Aluko, 2017).

Edestin, kako je rečeno u radu Aluko (2017) ima veliku sposobnost emulgiranja, odnosno pokazuje hidrofobni karakter što mu omogućava dobru interakciju s uljnom fazom. Ovo svojstvo značajno je jer pokazuje mogućnost dodavanja u hranu koja ima svojstvo emulzije ulje u vodi.

### **2.2.2.2. Albumin**

Aluko (2017) u svom radu utvrdio je kako albumin svojom fleksibilnom, hidrofilnom strukturom sprječava ekstenzivno nabiranje proteina i stoga je većina pobočnih aminokiselinskih ostataka u kontaktu s okolinom. Zbog toga albumin ima veću fleksibilnost i manje kompaktnu strukturu od globulina, međutim i usporedbom njihovih sekundarnih struktura utvrđeno je kako albumin ima uređeniji raspored polipeptida za razliku od globulina.

Kako albumin ima uređeniju sekundarnu strukturu te visok stupanj fleksibilnosti tako je i njegova topivost kao i kapacitet pjenjenja bolja za razliku od kompaktnijeg globulina, odnosno može se reći kako ima bolja funkcionalna svojstva.

### 2.2.2.3. Aminokiselinski sastav proteina konoplje

Tablica 3. Udio esencijalnih aminokiselina u sjemenu konoplje, izraženo u gramima na 100 g (Callaway, 2004) te preporučena dnevna doza u mg/kg (WHO, 2007)

Aminokiselina	Sjeme konoplje sa 25 % proteina (g/100g)	Preporučena dnevna doza WHO 2007. (mg/kg)
Histidin	0,71	10
Izoleucin	0,98	20
Leucin	1,72	39
Lizin	1,03	30
Metionin	0,58	10
Fenilalanin	1,17	25
Treonin	0,88	15
Triptofan	0,20	4
Valin	1,28	26

U Tablici 3. nalaze se rezultati Callaway-evog istraživanja prema kojemu možemo uočiti kako sjeme konoplje sadrži određene količine svih esencijalnih aminokiselina. House i sur. (2010) izvijestili su da je količina aminokiselina lizin, leucin i triptofan između 0,5 i 1,0 te su ukazali kako konzumacija samo sjemena konoplje ne bi zadovoljila minimalni dnevni unos ovih aminokiselina prema preporukama koje daje FAO/WHO (*World Health Organization - Svjetska zdravstvena organizacija*).

Osim esencijalnih aminokiselina, sjeme konoplje sadrži i ostale za zdravlje pogodne aminokiseline. Prema istraživanju Leonarda i sur. (2020) vidljivo je kako proteini konoplje imaju velike količine arginina i glutaminske kiseline. Arginin je prepoznat u nekoliko kliničkih studija zbog svoje značajne uloge u detoksikaciji amonijaka, rastu fetusa i smanjenju rezistencije na inzulin (Wu i sur., 2009). Zhou i Danbolt (2014) također su naglasili vitalnu ulogu glutamata, kao neurotransmitera u mozgu.

#### **2.2.2.4. Funkcionalna svojstva proteina konoplje**

Funkcionalna svojstva proteina uvelike ovise o konformaciji samog proteina, jačini intermolekularnih veza, ali isto tako ovise i o čimbenicima kao što su pH, temperatura te koncentracija soli.

Dodatkom malih koncentracija soli dolazi do povećanja topivosti proteina na način povećanja interakcija između iona soli i same površine proteina koja je nabijena, a kako su soli jaki elektroliti stvaranje interakcija dovodi do bolje hidratacije proteina, to jest bolje interakcije samog proteina i otapala. Osim što rastu interakcije između otapala i proteina, istovremeno se smanjuju interakcije između proteina jer se u ovom slučaju nalaze u konkurenciji s jakim elektrolitom, rezultat ovih interakcija je bolja topivost proteina. Međutim, ukoliko se doda veća količina soli te dođe do porasta koncentracije slobodne soli u otopini, tada dolazi do efekta izoljavanja. Slobodna sol, budući da je jaki elektrolit, veže na sebe vodu koju u konačnici i odvlači s proteina, a kako na taj način protein ostaje bez hidratacijskog plašta, interakcije protein - protein su sve jače te se i topivost posljedično smanjuje.

Promotri li se rezultati dobiveni u radu Potin i sur. (2019), koji su između ostalog promatrali utjecaj pH i koncentracije soli na topivost proteina, uočava se povezanost ova dva faktora. Ukupni sadržaj dušika u vodenom ekstraktu blago se povećao dodatkom NaCl-a pri pH 9, što ukazuje na efekt usoljavanja, iznad ovoga pH, dolazi do smanjenja ukupnog sadržaja dušika u vodenim ekstraktima dodatkom NaCl-a, tim više što je pH bio alkalniji, dolazi do efekta izoljavanja (Potin i sur., 2019). Također, oni su u svome radu ukazali kako je globulin, kojeg udjelno ima najviše (60 - 80%), najmanje topiv pri pH 5, potom u rasponu od 5 do 3 dolazi do blagog porasta topivosti, a od 5 do 9 značajnog smanjenja topivosti. Što se tiče temperature, denaturacija proteina konoplje započinje na temperaturi od 86°C, a potpuna denaturacija nastupa na temperaturi od 95°C (Tang i sur., 2006).

Funkcionalnost proteina konoplje najviše ovisi o pH vrijednosti. Njegova topivost, stabilnost i aktivnost emulzije te kapacitet i stabilnost pjenjenja su najmanji u rasponu pH od 4 do 6 gdje se i nalazi izoelektrična točka proteina, a naglo se povećava iznad pH 9 (Malomo i sur., 2014).

Zaključno, Tang i sur. (2006) u svome radu govore kako proteini konoplje, uspoređujući ih s drugim biljkama, imaju manju ukupnu topivost, emulgirajuću aktivnost i stabilnost te smanjenu sposobnost vezivanja vode. Što je više slobodnih sulfhidrilnih skupina u bjelančevinama konoplje to je više kovalentnih disulfidnih veza, veća je sklonost agregaciji.

## **2.3. PREDTRETMANI POGAČE**

Kako bi se postiglo što veće iskorištenje biljnog materijala te kako bi se olakšala ekstrakcija proteina, u ovome slučaju konopljinu pogača podvrgnuta je različitim metodama predpripreme kao što su mljevenje, prosijavanje te tretiranje ultrazvukom visokog intenziteta.

### **2.3.1. Mljevenje**

Mljevenje je tehnološka operacija, kojom se, primjenom mehaničke sile smanjuje veličina čestica čvrstih materijala. Stupanj usitnjavanja ovisi o brojnim faktorima kao što su jačina primijenjene sile te vrijeme kojem je materijal podvrgnut mljevenju, ali i o sastavu samog materijala, posebno udjelu vode. Postoje brojni uređaji koji se koriste za mljevenja, no u ovom radu korišteni su kriogeni mlin te rotacioni mlin.

#### **2.3.1.1. Rotacioni mlin**

Princip rada rotacionog mlina je takav da se materijal puni preko nasipnog koša u komoru za mljevenje. U komori se nalazi niz fiksnih čekića pričvršćenih na osovinu koji se rotiraju velikom obodnom brzinom i udaraju materijal unutar malog otvora. Mljevenje se prvenstveno svodi na udar, ali dolazi i do mrvljenja materijala koji se melje. Zamjenjiva sita u donjem dijelu komore za mljevenje omogućavaju dobivanje različitih stupnjeva finoće mljevenog materijala. Usitnjeni materijal pada kroz sito u kolektor, dok se ostatci materijala usitnjavaju do postizanja željenog stupnja finoće.

#### **2.3.1.2. Kriogeni mlin**

Proces mljevenja materijala u kriogenom mlinu započinje tako da se materijal koji se melje šalje iz spremnika u dozator, potom u pužni prijenosnik. U pužnom prijenosniku osnovni materijal prska se tekućim dušikom kroz specijalno izrađene mlaznice, materijal se hladi i dozira u mlin, unoseći nisku temperaturu u proces mljevenja. Temperaturna sonda, kontrolni i sigurnosni ventil za tekući dušik prate i reguliraju količinu tekućeg dušika koja je neophodna za održavanje zadanog radnog režima. Pri dovoljno niskim temperaturama (primjenjuju se temperature do  $-196^{\circ}\text{C}$ ) čestice postaju lako lomljive te se smanjuje mehanička energija potrebna za njihovo usitnjavanje (Kostić, 2017).

Smanjenjem veličine čestica može se poboljšati interakcija spoj - otapalo što dovodi do bolje ekstrakcije (Habuš, 2018) iz tog razloga u ovom radu obrađena su i dva uzorka pogače dobivena na dva različita načina mljevenja, a radi razmatranja utjecaja na izolaciju proteina konopljinu pogače.

### **2.3.2. Prosijavanje**

Prosijavanje je tehnološka operacija kojom se smjesa čestica (zrnaca) različite veličine razdjeljuje na frakcije jednake veličine čestica pomoću prevlaka na sitima tj. otvora određene veličine. Prosijavanje je izrazito važan predtretman jer se osigurava izdvajanje ljuske sjemena koja je siromašna proteinima. Također, ako su čestice materijala ujednačene, u ovome radu to je odmašćena konopljina pogača, omogućuje se ravnomjerna interakcija spoja i otapala, odnosno bolja i kvalitetnija ekstrakcija proteina.

### **2.3.3. Ultrazvuk visokog intenziteta**

Kada se na uzorak djeluje ultrazvukom visokog intenziteta (16 Hz - 16 kHz) dolazi do stvaranja kavitacija koje uzrokuju bubrenje stanica te probijanje staničnih stjenki što osigurava bolji ulaz otapala, a razaranjem stanične stjenke omogućeno je lakše otpuštanje staničnih sastojaka i time dolazi do povećanja prijenosa mase. Zato se kao glavna prednost primjene ultrazvuka visokog intenziteta navodi brža i učinkovitija ekstrakcija. Djelovanje ultrazvučne snage visokog intenziteta je prolaskom ultrazvučne zrake popraćeno stvaranjem visokog tlaka, smicanja i temperaturnog gradijenta unutar prehrambenog sistema (Brnčić i sur., 2009). Pojić i sur. (2018) kao negativne strane primjene ultrazvuka kao predtretmana navode promjene u strukturi proteina, kao i moguću denaturaciju te promjene u funkcionalnim svojstvima (smanjena sposobnost emulgiranja i pjenjenja) posebno u slučaju visokih intenziteta i dugotrajnom tretiranju.

Kako bi ekstrakcija bioaktivnih tvari ultrazvukom visokog intenziteta bila što uspješnija, osim otapala, temperature i tlaka samog materijala koji se tretira, potrebno je voditi računa i o vremenu tretiranja, frekvenciji, jačini ultrazvuka te raspodjeli ultrazvučnih valova.

### **2.3.4. Visokonaponsko električno pražnjenje (HVED) i impulsno električno polje (PEF)**

PEF se obično definira kao netermalni tretman, koji onemogućava neželjene promjene u biološkom materijalu, što je od posebnog interesa za ekstrakciju proteina (Pojić i sur., 2018). Djelovanjem impulsnog električnog polja dolazi do pucanja staničnih membrana te je omogućena hladna difuzija unutarstaničnog materijala.

Roselló-Soto i sur. (2015) uspoređivali su visokonaponsko električno pražnjenje (HVED), impulsno električno polje (PEF) te ultrazvuk (UV) kao predobrade prije ekstrakcije proteina i fenolnih spojeva iz koštice masline. Rezultati su pokazali kako PEF metoda nije utjecala na porast u udjelu ekstrahiranih proteina, međutim HVED metoda te primjena



ultrazvuka je utjecala na povećanje ekstrahiranih proteina. Otkrili su i kako je HVED tretman učinkovitiji od ultrazvuka i pulsiranog električnog polja u smislu unosa energije i učinkovitog vremena tretiranja.

Kao glavna prednost HVED i PEF metode u radovima navodi se, osim povećane učinkovitosti, i to što ove metode ne utječu na promjenu strukture proteina te su ekološki prihvatljive.

## **2.4. METODE IZOLACIJE PROTEINA**

Sve metode izolacije proteina konoplje, kako u ovome radu tako i u ostalim radovima, započinju kiselinsko-baznom ekstrakcijom i to najčešće na način opisan u radu Tang i sur. (2006) kojom se dobiva nativni proteinski izolat. Međutim, kako bi se poboljšala funkcionalna svojstva proteina konoplje uz samu kiselinsko-baznu ekstrakciju provode se razne metode ukomponirane u sam proces izolacije proteina konoplje.

### **2.4.1. Kiselinsko – bazna ekstrakcija**

Proteinski izolati uglavnom se dobivaju otapajući izvor bogat proteinima u mediju u kojem je pH daleko od izoelektrične točke, nakon čega slijedi koncentriranje otopina u okruženju gdje je pH blizu izoelektrične točke solubiliziranih proteina (Hadnadjev i sur., 2017). Tang i sur. (2006) proteinski izolat dobili su na način da je konopljinu pogači koja je pomiješana s vodom, pH vrijednost prvo podešena na 10 dodatkom 1M NaOH, potom su neproteinski dijelovi odvojeni centrifugom, a dobivenom supernatantu pH je podešen na 5 dodatkom 1M HCl-a, te je otopina ponovno centrifugirana kako bi se proteinski izolat konoplje istaložio. Teh i sur. (2014) su nakon slične ekstrakcije utvrdili kako je kiselinsko - bazna ekstrakcija dovela do konformacijskih promjena proteina, izlažući dodatna hidrofilna mjesta za vezanje vode.

U alkalnim uvjetima polifenoli, koji se mogu naći u mnogim biljnim materijalima, oksidiraju i potom mogu reagirati s proteinima što rezultira tamnozelenom ili smeđom bojom ekstrahiranih otopina proteina. Nakon taloženja u izoelektričnoj točki i nakon nekoliko koraka pranja, dobivena boja se ne može ukloniti iz proteinskih izolata (Hadnadjev i sur., 2017). Kao negativne strane kiselinsko – bazne ekstrakcije navodi se denaturacija proteina, zbog ekstremnih pH uvjeta, te velika potrošnja kiselina, lužina i vode. Zbog navedenog, sve više pozornosti privlače metode koje su ekološki prihvatljivije, ali i jednako učinkovite kao primjerice kombinacija vode i enzima, micelizacija, primjena ultrazvučnih tehnologija, visokog hidrostatskog tlaka.

### **2.4.2. Micelizacija**

Micelizacija uključuje ekstrakciju proteina otopinom soli, centrifugiranje kako bi se uklonile netopive tvari, taloženje iz ekstrakta soli ultrafiltracijom, diafiltracijskom membranom ili razrjeđivanjem u hladnoj vodi, nakon čega slijedi obnavljanje proteina centrifugiranjem (Hadnadjev i sur., 2017). Ovaj način ekstrakcije proteina pokazao je kako dobiveni izolat proteina ima uređeniju strukturu kao i manji udio denaturiranih proteina za razliku od izolata dobivenih kiselinsko - baznom ekstrakcijom. Također, primjenom micelizacije ne dolazi do oksidacije polifenola pa tako ni njihove ekstrakcije te se dobiva izolat svjetlije boje.

### **2.4.3. Termičko tretiranje**

Leonard i sur. (2020) shematski su u svome radu prikazali da ako se smjesa konopljine pogače tijekom izolacije proteina tretira samo termički, dobiveni proteinski izolat pokazat će smanjenu topivost, no ako se uz termičko tretiranje primjenjuje i pomak pH vrijednosti, u odnosu na početni, dobivenom proteinskom izolatu poboljšat će se topivost. Također, rezultati ukazuju i na veću stabilnost emulzije ukoliko se smjesa konopljine pogače tijekom kiselinsko - bazne ekstrakcije i zagrijava. Međutim, povećanje temperature može uzrokovati toplinsku denaturaciju proteina i taloženje što smanjuje nutritivnu vrijednost proteinskog izolata. Stoga su uobičajene sobne ili malo veće temperature od sobne za ekstrakciju proteina (Hadnadjev i sur., 2017).

### **2.4.4. Enzimska hidroliza**

Najčešće korištena metoda koja se primjenjuje nakon kiselinsko - bazne izolacije proteina iz konopljine pogače u brojnim radovima je enzimski hidroliza, kojom su se poboljšavala funkcionalna svojstva proteinskog izolata. Općenito ova metoda uključuje dodavanje različitih enzima kako bi se povećala količina ekstrahiranih proteina i smanjila oštećenja proteina tijekom ekstrakcije. Tang i sur. (2009) primijenili su enzimsku hidrolizu na način da je 10 g liofiliziranog proteinskog izolata (dobivenog kiselinsko - baznom ekstrakcijom) otopljeno u 200 ml deionizirane vode na sobnoj temperaturi. Disperzije su prethodno inkubirane na optimalnim katalitičkim temperaturama pojedinih proteaza, prije podešavanja pH disperzija na tražene vrijednosti. Omjer prema supstratu (E/S) za sve slučajeve bio je 5% na osnovi težine. Smjese proteina i enzima inkubirane su u vodenoj kupelji s regulacijom temperature gdje je pH konstantno održavan. Na kraju, reakcije su zaustavljene toplinskom obradom u kipućoj vodi te su potom odmah ohlađene u ledenoj vodi do sobne temperature. Smjese su neutralizirane i centrifugirane te su supernatanti liofilizirani.

Primjenom enzimatske hidrolize tijekom ekstrakcije ili na nativnom proteinskom izolatu došlo je do povećanja iskorištenja, veće topivosti proteina, bolje disperzije, ali i smanjene sposobnosti emulgiranja i pjenjenja. Enzimatska hidroliza mogla bi se primijeniti ne samo kao tehnika za modificiranje svojstava proteina hrane, nego i kao sredstvo za oplemenjivanje tih proteina s dodatnom vrijednošću, odnosno potencijalno korisni učinci na zdravlje (Wang i sur., 2019). Ekstrakciju proteina pomoću enzima karakterizira dugo vrijeme obrade, visoki operativni troškovi, velika potrošnja energije, nepovratni poremećaj matriksa ugljikohidratno-proteinskih matrica i potreba pažljivog prilagođavanja procesnih parametara (pH i temperature) (Pojić i sur., 2018).

#### **2.4.5. Aciliranje**

Još jedna od metoda koja se koristi za poboljšanje funkcionalnih svojstava proteina u nativnom obliku je aciliranje, odnosno uvođenje acilne skupine u organske molekule. Oblici aciliranja koji se koriste su sukcinilacija i acetiliranje. Pri pH vrijednostima 6,0 i više, sukcinilacija ili acetilacija dovode do značajno poboljšane topivosti proteina u usporedbi s nativnim izolatom proteina konoplje (Aluko, 2017). Smatra se da je poboljšani indeks aktivnosti emulgiranja, odnosno sposobnost stvaranja emulzije proteinskog izolata aciliranih uzoraka posljedica povećanog razmatanja proteina. Naime, razmotani proteini imaju izloženije hidrofobne skupine koje mogu učinkovitije komunicirati s kapljicama ulja u usporedbi s kompaktnijim nativnim proteinskim izolatom (Aluko, 2017).

#### **2.4.6. Soxhlet metoda i homogenizacija pod visokim tlakom**

Leonard i sur. (2020) kao metode dobivanja konopljinog proteinskog izolata navode i odmašćivanje s heksanom ili Soxhlet metodu gdje je uočena smanjena stabilnost emulzije, te na kraju primjenu homogenizacije pod visokim tlakom na nativni proteinski izolat dobiven kiselinsko - baznom ekstrakcijom. Funkcionalna svojstva ovih izolata pokazuju bolju stabilnost emulzije, povećanu viskoznost te oksidativnu stabilnost, ali i smanjenu mikrobnu populaciju.

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJAL

Pogača i ulje od sjemena konoplje proizvedeni su laboratorijskim dvostrukim hladnim prešanjem (radi većeg iskorištenja ulja iz pogače) na pužnoj preši (Komet, model CA/53, Monforts & Reiners, Rheydt, Njemačka), u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, iz sjemena konoplje uzgojenog na području Slavonije 2020. od proizvođača Horki d.o.o. Nakon proizvodnje ulje je centrifugirano radi uklanjanja taloga (5000 okr/20min) i pakirano u tamnu bocu. Pogača je mljevena na cilindričnom mlinu i skladištena u hladnjaku pri temperaturi od 4°C zajedno s proizvedenim uljem.

### 3.2. METODE RADA

#### 3.2.1. Određivanje udjela ulja u sjemenu i pogači konoplje

Za određivanje udjela ulja u sjemenu i pogači konoplje korištena je standardna ISO metoda ekstrakcije po Soxhlet-u (HRN EN ISO 659:2010). Princip metode po Soxhlet-u temelji se na višekratnoj kontinuiranoj ekstrakciji uzorka u aparaturi po Soxhlet-u s odgovarajućim otapalom. U čahurama za ekstrakciju na analitičkoj vagi izvagano je po 10 g mljevenog sjemena konoplje (određivane su po dvije paralele za svaki uzorak). Mljevenje uzorka provedeno je u električnom mlinu za kavu (sjeme). Izvagani uzorak u čahuri je zatvoren vatom i stavljen u ekstraktor. Nakon toga je dodan petroleter (otapalo), a ekstrakt se skupljao u tikvicu u koju su bile dodane 2-3 kuglice za vrenje. Kada je proces ekstrakcije završen, otapalo je otpareno, a ostatak je stavljen na sušenje u sušionik pri  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  sve dok se nije postignula konstantna masa.

Rezultati se izražavaju kao srednja vrijednost dva paralelna određivanja s tim da razlika ne prelazi 0,5%.

Maseni udio ulja izračunava se prema jednadžbi [1]:

$$\text{udio ulja (\%)} = \frac{m_1 - m_0}{m_2} * 100$$

gdje je:

$m_0$  = masa prazne epruvete (g)

$m_1$  = masa pune epruvete (g)

$m_2$  = masa uzorka (g).

### 3.2.2. Određivanje sastava masnih kiselina pomoću plinske kromatografije

Identifikacija masnih kiselina provedena je pomoću plinske kromatografije (GC) prema standardnoj metodi HRN EN ISO 12966-4:2017, uz prethodno prevođenje masnih kiselina u metilne estere kao oblik pogodan za analizu prema HRN EN ISO 12966-2:2017 metodi.

Otopljeno je 0,1 g uzorka nepolarnog suhog ekstrakta pogače u 2 ml izooktana, nakon čega je dodano je 0,1 ml 2 M metanolne otopine KOH te je epruveta miješana 60 sekundi. Nakon bistrenja reakcijske smjese i odvajanja glicerolnog sloja na dnu, u epruvetu je dodano 2 ml zasićene otopine natrijevog klorida te je sve promiješano. Gornji, izooktanski sloj izdvojen je u drugu epruvetu te mu je dodan 1 g bezvodnog natrijevog hidrogensulfata (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska), dok je dobiveni supernatant prebačen u vijalicu i analiziran na plinskom kromatografu.

Analiza dobivenih metilnih estera provedena je na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network uz plameno-ionizacijski detektor (Agilent, Santa Clara, SAD) te započinje injektiranjem male količine uzorka na početak kromatografske kolone DB-23 (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm), koja je termostatorana, gdje se uzorak rasplina te miješa s mobilnom fazom. Uzorak se giba kroz kolonu nošen plinom nositeljem, odnosno helijem protokom od 1,5 ml  $\text{min}^{-1}$  uz split 60:1, te se spojevi razdvajaju na temelju različite raspodjele između plinovite mobilne faze i imobilizirane stacionarne faze. Temperatura injektora postavljena je na 250°C, a temperatura detektora na 280°C. Temperatura pećnice je programirana da raste 7°C  $\text{min}^{-1}$  od 60°C do 220°C, uz zadržavanje na maksimalnoj temperaturi od 17 minuta. Na kraju kolone mobilna faza s odijeljenim analitom prolazi kroz detektor. Detektori pokazuju brz odaziv na male promijene koncentracije sastojka tijekom njihovog eluiranja iz kolone, te detektirane promijene konvertiraju u električni signal koji se ispisuje kao kromatogram.

Kvalitativno određivanje masnih kiselina provedeno je usporedbom retencijskih vremena njihovih metilnih estera s retencijskim vremenima komercijalnih, sastavom poznatih standarda. Metodom normizacije površine ispod pikova, računa se pojedinačni udio masne kiseline i izražava kao % od ukupnih masnih kiselina.

Analiza je provedena u 2 paralelna određivanja, a rezultati su prikazani kao njihova srednja vrijednost.

### **3.2.3. Mljevenje rotacionim mlinom i prosijavanje**

Pomoću rotacionog mlina, 580 g odmašćene konopljine pogače mljeveno je na način ubacivanja konopljine pogače preko nasipnog koša u komoru za mljevenje. Nakon pokretanja motora, čekići svojom rotacijom udaraju i tako melju pogaču koja potom pada kroz sito u kolektor. Kako bi se dobila što jednoličnije samljevena pogača, nakon mljevenja izvršeno je prosijavanje kroz sito čiji je otvor promjera 450  $\mu$ .

### **3.2.4. Mljevenje kriomlinom**

Od ukupno dobivenih 580 g odmašćene konopljine pogače, izvagano je 50 g na tehničkoj vagi (RADWAG Wagl Elektroniczne, Poljska) te je nakon toga mljeveno na vibracijskom kriomlinu sa spremnikom za tekući dušik (Retsch+Apollo, Haan, Njemačka).

Mljevenje se provodilo na način da se uzorak konopljine pogače prebacio u posudu za mljevenje uz dodatak 12 malih metalnih kuglica promjera 10 mm. Posuda se zatim stavila u cilindar, zatvorila čepom i dobro stegnula odvijačem kako ne bi došlo do curenja uzorka prilikom procesa mljevenja. Nakon mljevenja, uzorak se čuvao u hladnjaku na 4°C.

Prije početka mljevenja uz hlađenje, bilo je potrebno otvoriti ventil za dovod dušika i namjestiti željene parametre: predhlađenje, vrijeme mljevenja, broj kriociklusa (u ovom istraživanju 1) i frekvenciju (30 Hz). Zbog optimizacije tlak dušika na izlazu iz spremnika tijekom cijelog procesa održavan je na 1,3 bara. Nakon provedenog mljevenja, uzorak je izvađen iz posude, a cilindar odmah zatvoren radi sprječavanja ulaska vlage.

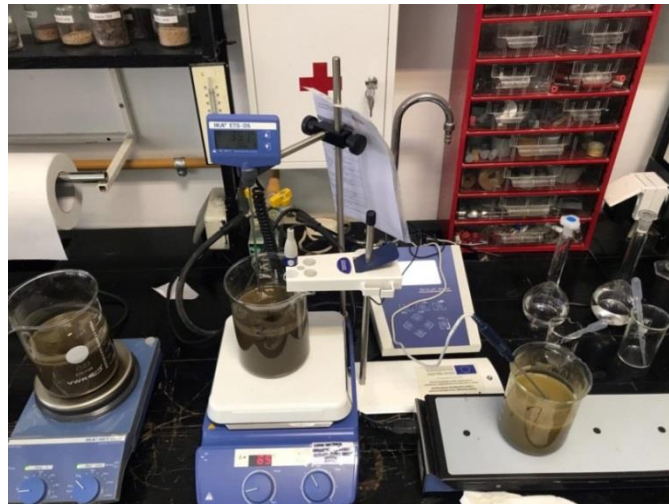
### **3.2.5. Izolacija proteina**

Kako je glavni cilj ovoga rada dobiti količinski što više proteinskog izolata konopljine pogače sa što većim udjelom proteina, tako su na osnovni princip dobivanja proteinskog izolata, koji je proveden po uzoru na kiselinsko - baznu ekstrakciju Tang i sur. (2006), korištene razne modifikacije kako bi se došlo do postupka kojim se dobivaju najbolji rezultati. Na tragu tog istraživanja, osim otapanja pogače u destiliranoj vodi, korištena je i 0,5 M otopina NaCl-a. Nadalje, korištene su metode poput tretiranja uzorka ultrazvukom visokog intenziteta, različitog vremena miješanja prije prve centrifuge, iscrpljivanja taloga te različiti omjeri vode i pogače.

#### Osnovni princip postupka:

Na tehničkoj vagi u laboratorijskoj čaši izvagano je 25 g mljevene konopljine pogače. Potom, je dodan određeni volumen otapala i ta smjesa je stavljena na magnetsku miješalicu gdje se uz konstantno miješanje zagrijavala do 35°C u trajanju od 30 minuta. Zatim je podešen pH

na 10 (u jednom uzorku 12) pomoću 1 M NaOH, a ovi uvjeti (pH i temperatura) održavani su tijekom određenog vremena. Potom je smjesa 20 minuta centrifugirana s 5000 okretaja (centrifuga - Rotina 380, Hettich, Njemačka), a zatim je supernatant vraćen na magnetsku miješalicu gdje mu je pH podešen na 5 pomoću 1M HCl-a te je otopina ponovno centrifugirana na istoj centrifugi s istim brojem okretaja i u jednakom vremenskom trajanju. Dobiveni talog prebačen je u Petrijevu zdjelicu te je razrijeđen deioniziranom vodom i neutraliziran dodatkom 1 M NaOH. Talog je stavljen na sušenje na temperaturu od 40°C.

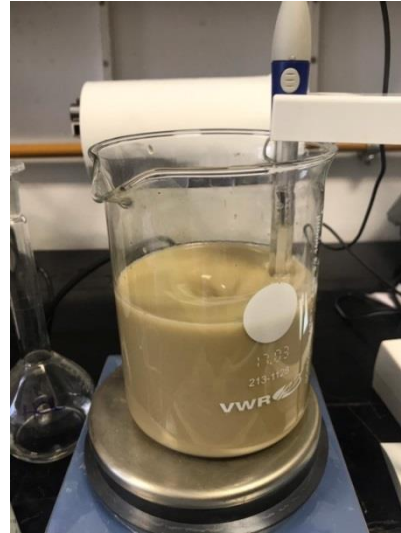
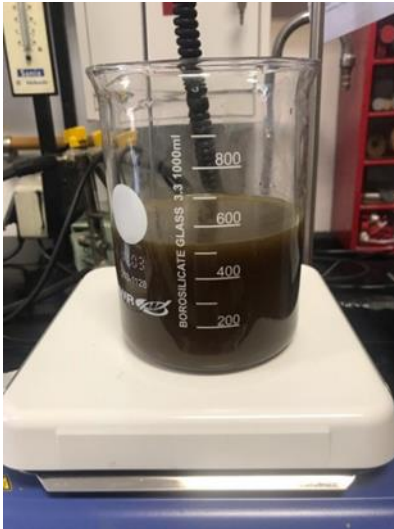


*Slika 2. Održavanje lužnatog medija u smjesi konopljine pogače, Laboratorij za tehnologiju ulja i masti (vlastita fotografija)*

Kako je već naprijed rečeno, cilj ovoga rada bio je dobiti količinski što više te što koncentriraniji proteinski izolat. Iz tog razloga korištene su sljedeće modifikacije na osnovni princip:

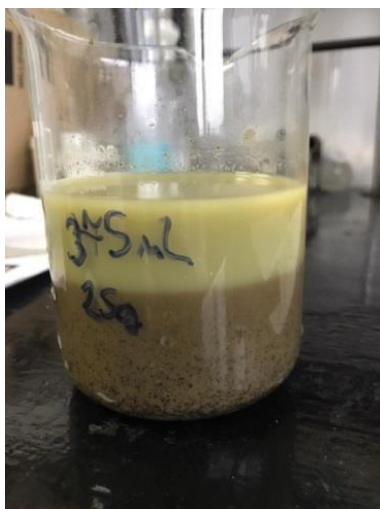
- a) Mljevena pogača otopljena je u različitim volumenima deionizirane vode - 1:15, 1:20 i 1:25, konstantno je miješana na magnetskoj miješalici 3 sata uz održavanje temperature od 35°C i pH 10. Ostatak postupka izolacije proveden je prema osnovnom principu.
- b) Mljevena pogača otopljena je u deioniziranoj vodi, omjera 1:25, a pH 10 i temperatura 35°C održavani su u različitom vremenskom trajanju i to u trajanju od 1, 2 i 3 sata, s ciljem utvrđivanja utjecaja vremena miješanja na kiselinsko - baznu ekstrakciju. Ostatak postupka proveden je prema osnovnom principu.

- c) Mljevena pogača otopljena je u deioniziranoj vodi, omjera 1:20, postavljena je na magnetsku miješalicu te joj je pH podešen i održavan na 12 zajedno s temperaturom od 35°C u vremenskom trajanju od 1 sat. Smjesa je potom, tretirana prema osnovnom principu.



*Slika 3. Smjesa konopljine pogače na pH 12 (lijevo), smjesa iste konopljine pogače pri pH 5 (desno) (vlastite fotografije)*

- d) Mljevena pogača otopljena je u deioniziranoj vodi, omjera 1:15 i 1:20 te je nakon 30 minuta miješanja i održavanja uvjeta pH 10 i 35°C stavljena u zamrzivač na određeno vrijeme (kako bi se temperatura same smjese spustila ispod 10°C) nakon kojeg je 12 minuta tretirana ultrazvukom (LAUDA MC 250, LAUDA-Brinkmann, Njemačka) pri najjačem intenzitetu, zatim je smjesa stavljena na prvo centrifugiranje i postupak se dalje nastavio prema osnovnom principu.



*Slika 4. Smjesa konopljine pogače nakon tretiranja ultrazvukom visokog intenziteta (vlastita fotografija)*



- e) Mljevena pogača otopljena je u otopini 0,5 M NaCl-a, omjera 1:15 i 1:20, nakon 30 minuta miješanja i održavanja uvjeta pH 10 i 35°C stavljena je u zamrzivač na određeno vrijeme (kako bi se temperatura same smjese spustila ispod 10°C) te je tretirana 12 minuta ultrazvukom (LAUDA MC 250, LAUDA-Brinkmann, Njemačka) pri najjačem intenzitetu, zatim je smjesa stavljena na prvo centrifugiranje i postupak se dalje nastavio prema osnovnom principu.
- f) Mljevena pogača otopljena je u deioniziranoj vodi, omjera 1:15, stavljena je u zamrzivač na 15 minuta, a nakon toga je 12 minuta tretirana ultrazvukom (LAUDA MC 250, LAUDA-Brinkmann, Njemačka), najjačim intenzitetom. Zatim je smjesa stavljena na magnetsku miješalicu te su joj pH 10 i temperatura 35°C održavani 1 sat, a potom je smjesa dalje tretirana prema osnovnom principu.
- g) Mljevena pogača dobivena u kriogenom mlinu otopljena je u deioniziranoj vodi, omjera 1:15, postavljena je na magnetsku miješalicu gdje su joj u trajanju od 1 sata održavani temperatura 35°C i pH 10. Smjesa je potom 20 minuta tretirana ultrazvukom (LAUDA MC 250, LAUDA-Brinkmann, Njemačka), najjačim intenzitetom, zatim je vraćena na magnetsku miješalicu te su joj u trajanju od 30 minuta održavani pH 10 i temperatura od 35°C. Smjesa je dalje tretirana prema osnovnom principu.

### **3.2.6. Određivanje udjela proteina u sjemenu**

Određivanje udjela proteina odvija se indirektno, to jest preko određivanja količine dušika, metodom po Kjeldahlu, u tri stupnja. Prvi je digestija (mokro spaljivanje), slijede destilacija pa titracija prema metodi ASN 3105 opisanoj u propisu proizvođača opreme (FOSS Analytical AB, 2003).

#### Mokro spaljivanje

Postupak se vrši na način da se 0,5 g uzorka (mljevene pogače ili sjemena konoplje ili proteinskih izolata koji su bili analizirani u ovome radu) izvaganih s točnošću  $\pm 0,001$  g stavi u kivete za digestiju. U kivetu se dodaju dvije Kjeldahl tablete (KT-250-A Wieninger Tablets, Kjeldahl Catalyst) i 15 ml koncentrirane sumporne kiseline. Reakcija se odvija u digestoru u kojem su kivete posložene u blok za spaljivanje i spojene na vakuum sisaljku. Spaljivanje se provodi postupnim početnim zagrijavanjem, slijedi višesatno zagrijavanje na maksimalnoj temperaturi sve dok se ne postigne potpuno bistra otopina. Kada je uzorak potpuno spaljen, ostavi se hladiti do postizanja sobne temperature uzorka. Paralelno s uzorcima priprema se i slijepa proba.

### Destilacija

U ohlađeni uzorak doda se 80 ml destilirane vode i kiveta se spoji s gumenim adapterom na Kjeltec 2100 destilacijsku jedinicu. Erlenmayerova tikvica s 25 ml borne kiseline (4%-tna otopina borne kiseline s indikatorima, bromkrezol zeleno i metil red) stavi se na platformu za prihvatnu tikvicu destilacijske jedinice. Automatski u kivetu se dozira 50 ml 40%-tne natrijeve lužine. Destilacija traje 4 minute. Nastali amonijak u sustavu skupi se u Erlenmayerovu tikvicu s bornom kiselinom.

### Titracija

Dobiveni destilat potom se titrira s 0,1 M otopinom HCl, a udio dušika u uzorku izračunava se prema formuli [2]:

$$\%dušika = \frac{(A - B) * C * 14,007 * 100}{m(mg)}$$

A - volumen (ml) HCl utrošen za titraciju uzorka

B - volumen (ml) HCl utrošen za titraciju slijepe probe

c - koncentracija HCl

m - masa uzorka uzetog za analizu u mg.

Nakon što se laboratorijskom analizom dobije udio dušika u uzorku, ta se vrijednost pomnoži s faktorom 6,25 koji je dobiven pod pretpostavkom da proteini sadrže u prosjeku 16% dušika.

$$\%proteina = \%N * 6,25 \quad [3]$$

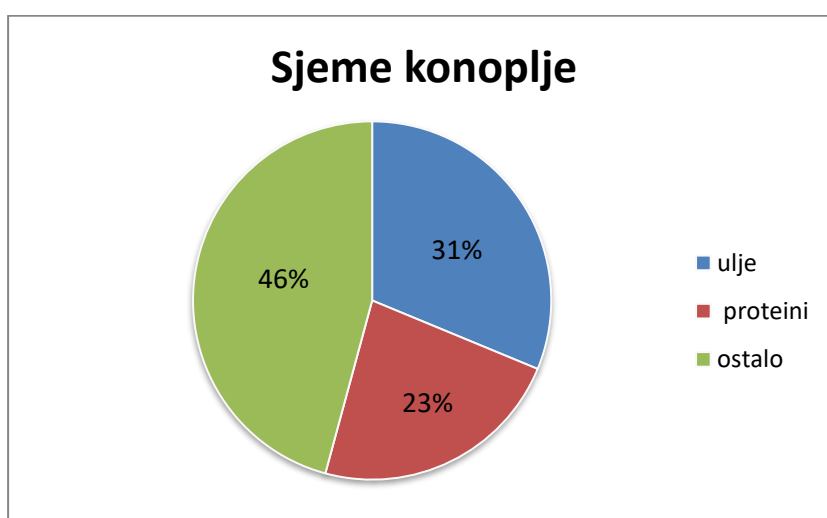
### **3.2.7. Obrada rezultata**

Za obradu rezultata analize te izradu grafova u ovom radu korišten je Microsoft Excel 2010 (Microsoft, 2010).

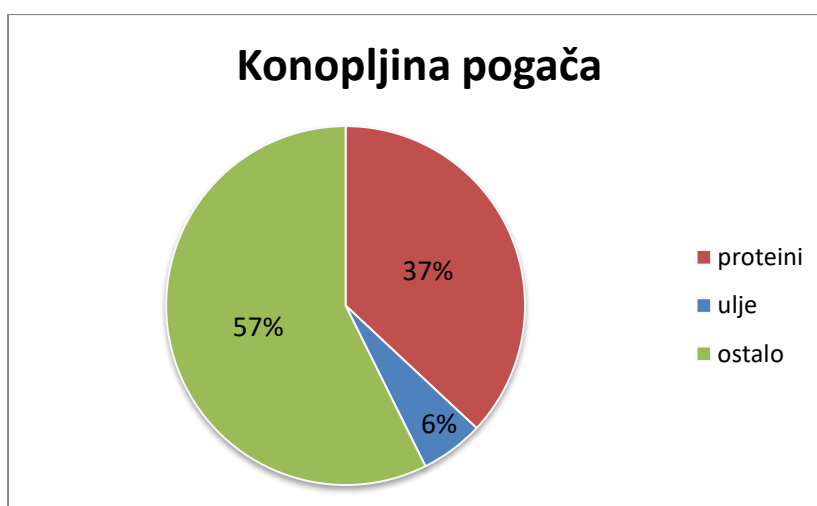
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Ciljevi ovoga rada bili su usmjereni na nusprodukt prešanja konopljinog sjemena, odnosno pogaču zbog njezinog nutritivnog sastava, a primarni cilj bio je izolirati što veću količinu izolata sa što većim udjelom proteina kako bi se omogućila i olakšala njegova uporaba i u prehrambenoj industriji.

### 4.1. UDIO ULJA I PROTEINA U SJEMENU I POGAČI KONOPLJE TE SASTAV MASNIH KISELINA U ULJU OD SJEMENA KONOPLJE



*Slika 5. Udio ulja i proteina u sjemenu konoplje*



*Slika 6. Udio ulja i proteina u konopljinoj pogači*

Analiza ulja od sjemena konoplje pomoću metode po Soxhletu dovela je do rezultata prikazanih na Slici 5. i 6., odnosno prije prešanja u sjemenu je bilo 31% ulja, a nakon dvostrukog hladnog prešanja te ponovljenom analizom utvrđeno je kako je u pogači zaostalo 6% ulja. Potin i sur. (2019) u svome radu objavili su kako sjeme prije prešanja sadrži 30,2% ulja, a nakon prešanja 8,7%. Iz navedenog proizlazi kako se rezultati dobiveni u ovome radu uglavnom podudaraju s rezultatima ostalih istraživanja kod kojih je udio proteina i ulja u sjemenu konoplje približno između 25 i 30%, dok se nakon prešanja udio proteina poveća za 10 do 15%

Udio proteina u konopljinoj pogači i sjemenu konoplje određen je prema Kjeldahlovom principu. Na Slici 5. udio proteina u sjemenu konoplje iznosi 23%, dok nakon dvostrukog hladnog prešanja sjemena dobivamo konopljinu pogaču s 36,97% proteina što je prikazano na Slici 6. Potin i sur. (2019) u svome radu za udio proteina u sjemenu konoplje navode iznos od 22,5%, a za pogaču 30%.

Tablica 4. Udio masnih kiselina u ulju sjemena konoplje

	<b>C12:0</b>	<b>C14:0</b>	<b>C16:0</b>	<b>C16:1</b>	<b>C17:0</b>	<b>C17:1</b>	<b>C18:0</b>	<b>C18:1</b>	<b>C18:2</b>	<b>C18:3n6</b>	<b>C18:3n3</b>	<b>C20:0</b>	<b>C20:1</b>	<b>C22:0</b>	<b>C22:2</b>
<b>Srednja vrijednost (%)</b>	0,02	0,05	6,74	0,15	0,13	0,18	2,79	13,16	55,46	1,54	17,77	0,95	0,47	0,34	0,25
<b>STDEV</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,003	0,001	0,000	0,002	0,001	0,000	0,000

Nakon provedene plinske kromatografije (GC) u Tablici 4. prikazane su masne kiseline detektirane u uzorku ulja sjemena konoplje. Osim što je iz Tablice 4. vidljiva dominacija nezasićenih masnih kiselina u manjem ili većem udjelu, najzastupljenije su upravo sljedeće nezasićene masne kiseline:

- linolenska masna kiselina (omega-6 ili C18:2)
- alfa-linolenska masna kiselina (omega-3 ili C18:3)
- oleinska masna kiselina (omega-9 ili C18:1).

Prema rezultatima navedenim u Tablici 4. koja prikazuje udjele masnih kiselina u ulju sjemena konoplje, možemo izračunati omjer omega-6 i omega-3 esencijalnih masnih kiselina:

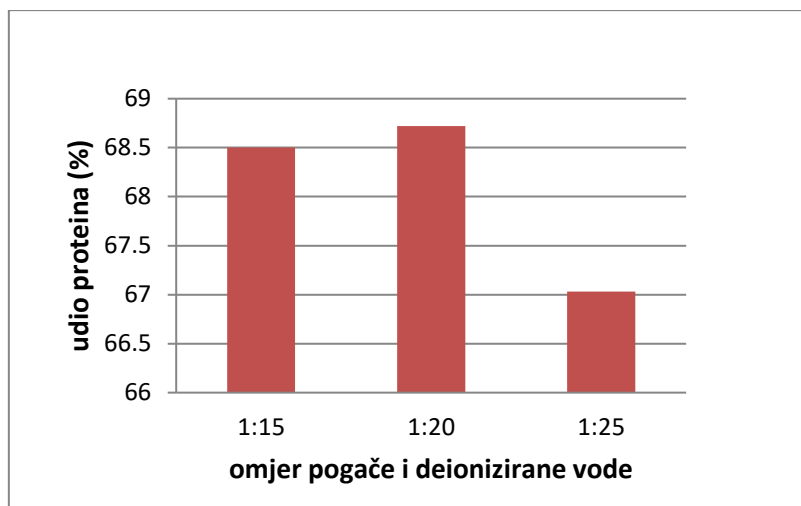
$$\frac{\text{omega} - 6}{\text{omega} - 3} = \frac{55,46}{17,77} = \frac{3,12}{1} = 3:1$$

Iako su WHO i FAO (1995) objavili kako je optimalan omjer omega-6 i omega-3 masnih kiselina za zdravlje ljudi između 5:1 te 10:1, novija istraživanja poput Callaway, (2004) pokazuju kako je taj omjer između 2:1 i 3:1 te da se upravo u tome omjeru nalazi u ulju sjemena konoplje što je potvrđeno i u ovome radu.

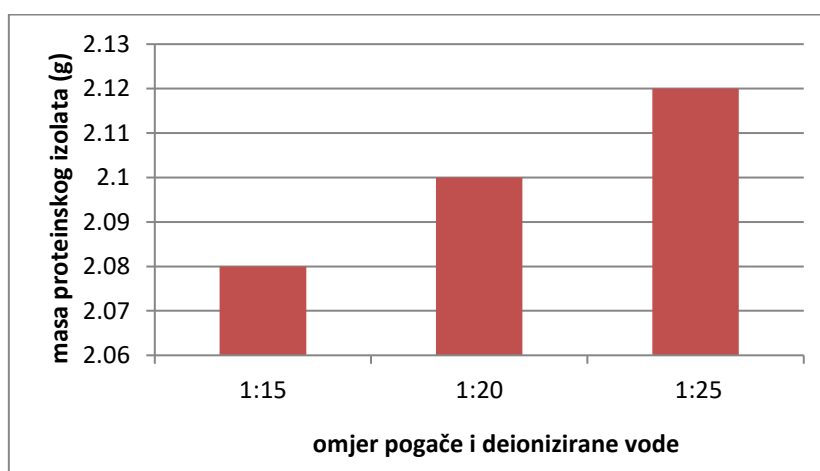
## **4.2. IZOLACIJA PROTEINA**

### **4.2.1. Utjecaj volumena deionizirane vode i vremena miješanja na udio proteina u uzorku**

Kao jedan od prvih parametara koji je promatran u ovom radu bio je utjecaj volumena deionizirane vode i vremena trajanja kiselinsko - bazne ekstrakcije na proteinski izolat.



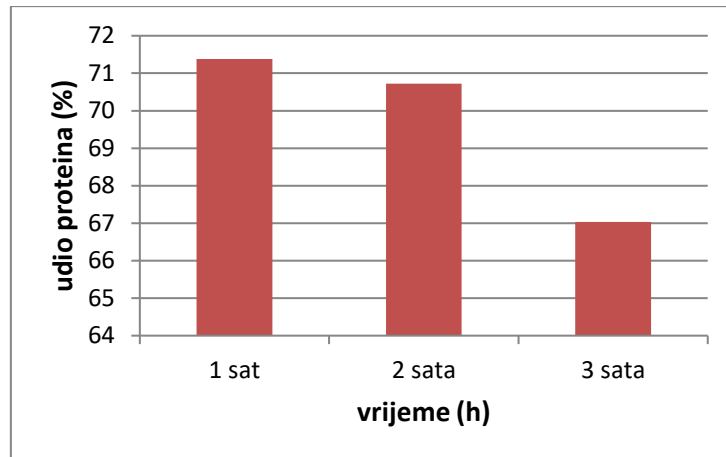
Slika 7. Udio proteina ovisno o volumenu deionizirane vode (3h ekstrakcije)



Slika 8. Masa proteinskog izolata u ovisnosti o volumenu deionizirane vode (3h ekstrakcije)

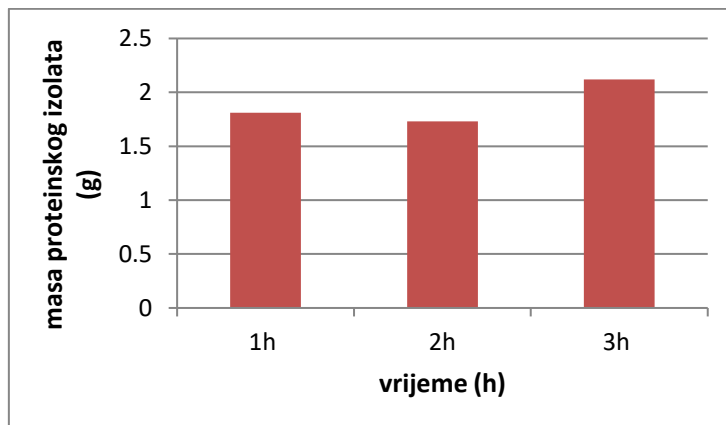
Slika 7. prikazuje udio proteina u smjesama s različitim omjerima mase konopljine pogače i volumena deionizirane vode, uz napomenu da su svi uvjeti, osim volumena deionizirane vode, bili konstantni. Iz dobivenog grafičkog prikaza ovisnosti omjera pogače i deionizirane vode na udio proteina, najveći udio proteina u proteinskom izolatu daje smjesa omjera 1:20, a najmanji smjesa omjera 1:25. Što se tiče mase proteinskog izolata, na Slici 8. vidljivo je kako se maseno najmanje proteinskog izolata dobiva iz smjese omjera 1:15, a najviše iz smjese omjera 1:25, iako postoji mala razlika između masa proteinskih izolata dobivenih iz smjesa omjera 1:20 te 1:25.

Ako se promatra kod kojeg omjera pogače i deionizirane vode se dobiva najviše proteinskog izolata s najvećim udjelom proteina, bez obzira na mali porast mase kod omjera 1:25, može se zaključiti kako je optimalan omjer pogače i deionizirane vode 1:20.



*Slika 9. Utjecaj trajanja ekstrakcije na udio proteina, omjer pogače i deionizirane vode 1:25*

Slika 9. prikazuje udio proteina u uzorcima (3) omjera mase konopljinje pogače i volumena deionizirane vode 1:25, gdje su lužnati pH 10 i temperatura od 35°C održavani 1, 2 i 3 sata. Iz dobivenih rezultata vidljiva je malo značajnija razlika u udjelu proteina, odnosno moguće je uočiti kako se najviše proteina ekstrahira u prvom satu, a nakon toga dolazi do postupnog smanjivanja udjela proteina u proteinskom izolatu konopljinje pogače.



*Slika 10. Utjecaj trajanja ekstrakcije na masu proteinskog izolata, omjer pogače i deionizirane vode 1:25*

Što se tiče utjecaja vremena na masu proteinskog izolata na Slici 10. vidljivo je kako odmakom vremena dolazi do blagog porasta u masi proteinskih izolata, međutim to ne znači da dolazi i do porasta u udjelu proteina (Slika 9.).

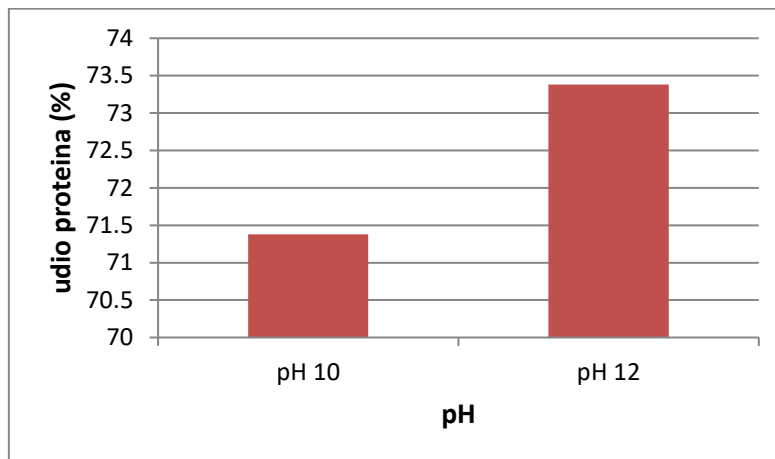
Prema različitim literaturnim podacima, vrijeme ekstrakcije obično se postavlja između 10 i 60 min uz stalno miješanje i na omjer krutina/otopina od 5 do 15% (w/v) (Hadnadjev i sur., 2017). Fetzer i sur. (2018) u svome radu proveli su istraživanje utjecaja procesnih uvjeta tijekom ekstrakcije proteina repice. Zaključili su kako u usporedbi s



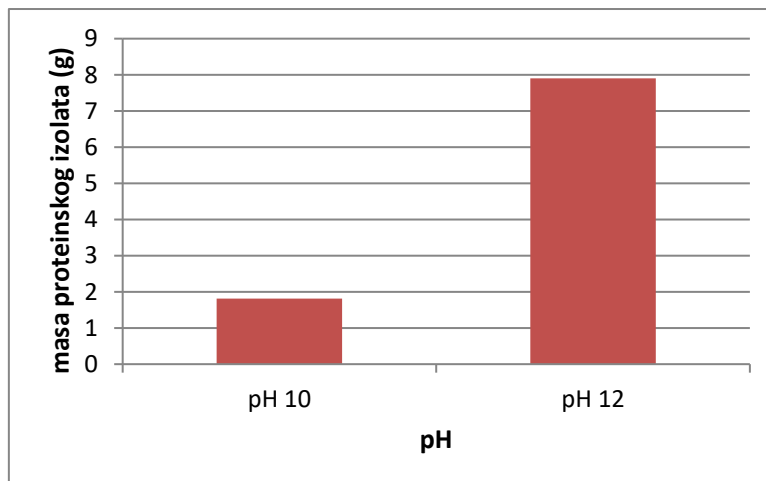
vremenom ekstrakcije od 30 minuta, povećanje vremena ekstrakcije nije dovelo do značajnog povećanja prinosa proteina za ispitivani raspon, također ni u različitim omjerima pogače i vode nije primijećeno značajnije povećanje prinosa.

#### 4.2.2. Utjecaj lužnatog pH na dobiveni izolat proteina

Na temperaturi od 35°C i u trajanju od jednog sata održavani su uzorci u omjeru 1:20 (mljevena pogača i deionizirana voda) jedan na pH 10, a drugi na pH 12 dodatkom 1 M natrijevog hidroksida.



Slika 11. Ovisnost udjela proteina o lužnatom pH



Slika 12. Ovisnost mase proteinskog izolata o lužnatom pH

Slika 12. prikazuje kako je pri pH 12 dobiveno skoro četiri puta više proteinskog izolata, nego pri pH 10, ali nema značajnije razlike u udjelu proteina kod ova dva uzorka (Slika 11.). Pri višoj pH vrijednosti, ekstrakcijski prinos solubiliziranog ukupnog dušika povećava se zajedno s pH s 8,4% pri pH 8 na 67,1% pri pH 12 (Potin i sur., 2019).

Prilikom otapanja taloga te prije same neutralizacije uočeno je, osim razlike u boji, i puno teže otapanje taloga kojemu je pH bio podešen na 12, odnosno dolazilo je do nastajanja grudica. Što je veća pH vrijednost, to su supernatanti bili obojeniji i zamućeniji, iz bezbojne i bistre otopine pri pH 2 do tamno smeđe i mutne otopine pri pH 12, što upućuje na solubilizaciju i/ili modifikaciju fenolnih spojeva pri alkalnom pH (Potin i sur., 2019).

#### 4.2.3. Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta i otopina NaCl-a

*Tablica 5. Usporedba različitih tretmana na uzorak konopljine pogače omjera 1:15 (pogača/otopina)*

<b>Uzorak</b>	<b>Masa uzorka nakon sušenja (g)</b>	<b>%proteina</b>
<b>Otopljen u deioniziranoj vodi, bez tretiranja UV-om</b>	2,08	68,5
<b>Otopljen u deioniziranoj vodi, tretiran UV-om</b>	2,66	59,38
<b>Otopljen u NaCl-u, tretiran UV-om</b>	1,64	61,48
<b>Otopljen u deioniziranoj vodi, tretiran UV-om prije kiselinsko - bazne ekstrakcije</b>	2,1	64,10

Promatrajući dobivene rezultate u Tablici 5., značajnija razlika može se uočiti jedino u udjelu proteina, ne i u masi proteinskih izolata. Najveći udio proteina dobiven je kiselinsko - baznom ekstrakcijom. Kod primjene ultrazvuka visokog intenziteta primjećuju se malo bolji rezultati kada je uzorak tretiran prije dodavanja 1 M NaOH, nego kada se uzorak tretira tijekom kiselinsko - bazne ekstrakcije (nakon dodatka 1 M NaOH i prije dodatka 1M HCl-a). Wang i sur. (2019) su u svom radu promatrali utjecaj zagrijavanja i tretiranja ultrazvukom na strukturu proteinskog izolata te su došli do zaključka kako tretman ultrazvuka uzrokuje samo makroskopske fizičke modifikacije, dok nativni proteini ostaju nepromijenjeni.

Jedan uzorak pripremljen je na način da je umjesto deionizirane vode, u omjeru 1:15, dodana otopina 0,5 M NaCl-a, odnosno došlo je do promjene ionske jakosti. Ovako tretiranim uzorkom dobivena je značajno manja masa nakon sušenja, no udio proteina ne odudara bitno od udjela proteina dobivenih različitim tretiranjima uzoraka. Efekti usoljavanja i isoljavanja, ovise o pH te o aminokiselinskom sastavu površine samog proteina. Što se tiče proteina konoplje Potin i sur. (2019) postavili su hipotezu kako dodatkom 0,5 M NaCl-a efekt usoljavanja se pojavljuje pri pH 9, no nadalje, što je pH lužnatiji dolazi do efekta isoljavanja, drugim riječima topivost proteina se smanjuje.

*Tablica 6. Usporedba različitih tretmana na uzorak konopljine pogače omjera 1:20 (pogača/otopina)*

<b>Uzorak</b>	<b>Masa uzorka nakon sušenja (g)</b>	<b>%proteina</b>
<b>Otopljen u deioniziranoj vodi, bez tretiranja UV-om</b>	2,1	68,72
<b>Otopljen u deioniziranoj vodi, tretiran UV-om</b>	2,61	34,38
<b>Otopljen u NaCl-u, tretiran UV-om</b>	1,6	65,81

Kod uzoraka gdje je omjer konopljine pogače i otopine 1:20 uočeno je kako je najveći udio proteina u proteinskom izolatu koji je dobiven samo kiselinom - baznom ekstrakcijom. U Tablici 6. vidljivo je značajnije odstupanje u rezultatima proteinskog izolata dobivenog uz primjenu ultrazvuka visokog intenziteta; iako je maseno dobiveno najviše proteinskog izolata, nakon provođenja metode po Kjeldahl-u utvrđeno je samo 34,38% proteina u izolatu (ovakav rezultat zahtijevao bi daljnje istraživanje).

Uspoređujući Tablicu 5. i 6. dobiveni rezultati su u skladu sa zaključkom do kojeg su došli Potin i sur. (2019) koji su uspoređujući utjecaj pH i ionske jakosti na proteinski izolat konopljine pogače zaključili kako utjecaj ionske jakosti na sadržaj dušika u vodenom ekstraktu proteina konoplje znatno varira ovisno o pH vrijednosti. Kod pH 10, dodatkom NaCl-a dobili su rezultate približne vrijednostima dobivenim bez dodatka NaCl-a te su zaključili da dodatak NaCl-a tijekom postupka hidratacije nije pospješio ekstrakciju proteina i nema utjecaj na profil polipeptida i ne mijenja značajno ukupan udio dušika (Potin i sur., 2019).

S obzirom na to da je vidljivo iz dobivenih rezultata u Tablicama 5. i 6. kako tretman ultrazvukom visokog intenziteta nije pridonio povećanju ekstrakcijskog prinosa možemo pretpostaviti kako je intenzitet bio prejak te samo vrijeme tretiranja predugo. Naime, brojni znanstveni radovi, pa tako i onaj Pojić i sur. (2018), naglašavaju kako ukoliko se tretiranje ultrazvukom primjenjuje za ekstrakciju proteina utoliko je potrebno uzeti u obzir ta dva parametra (vrijeme i intenzitet) jer najviše utječu na strukturu i funkcionalna svojstva proteina te mogu dovesti do denaturacije.

#### 4.2.4. Kriogeno samljevena konopljina pogača

*Tablica 7. Masa proteinskog izolata te udio proteina*

<b>Uzorak</b>	<b>Masa uzorka nakon sušenja (g)</b>	<b>%proteina</b>
<b>Kriogeno mljevena pogača</b>	3,18	48,47

Ako rezultate iz Tablice 5., gdje su proteinski izolati dobiveni iz konopljine pogače prosijane na situ čiji je otvor promjera 450  $\mu$ , usporedimo s Tablicom 7., odnosno proteinskim izolatima dobivenim iz kriogeno mljevene konopljine pogače, vidljivo je kako se iz kriogeno mljevene pogače kiselinsko - baznom ekstrakcijom, uz primjenu ultrazvuka visokog intenziteta, dobiva maseno najviše proteinskog izolata. Međutim, udio proteina u proteinskom izolatu kriogeno mljevene pogače je među najmanjim vrijednostima ovoga rada.

Russin i sur. (2007) u svojem istraživanju ukazuju na činjenicu kako se učinkovitost ekstrakcije i proizvodnje izolata sojinih proteina iz odmašćenog brašna može poboljšati smanjenjem prosječne veličine čestica početnog materijala. Praktično gledano, rukovanje s česticama manjih veličina u industrijskim pogonima ima svojih izazova, ali povećanje od 30% krutina te oporavak bjelančevina vrlo je snažan poticaj za razvoj novijih, učinkovitijih tehnika rukovanja (Russin i sur., 2007).

## 5. ZAKLJUČAK

- Proizvedeno hladno prešano ulje sjemena konoplje bogato je nezasićenim masnim kiselinama te sadrži optimalan omjer omega-6 i omega-3 esencijalnih masnih kiselina (3:1).
- Najveća masa te najveći udio proteina u proteinskom izolatu dobiven je uz ekstrakciju pri pH 12.
- Udio proteina se smanjuje nakon ekstrakcije od 60 minuta; optimalan omjer pogače i deionizirane vode je 1:20.
- Tretman ultrazvukom visokog intenziteta nije pokazao povećanje udjela proteina u izolatu konopljine pogače.
- Izolacija u otopini natrijeva klorida u kombinaciji s primjenom ultrazvuka visokog intenziteta pokazala je znatno manji udio proteina u konačnom izolatu.
- Primjena kriogenog mljevenja nije pokazala utjecaj na povećanje udjela proteina u usporedbi s mljevenjem na rotacionom mlinu.

## 6. LITERATURA

- Aiello G., Fasoli E., Boschini G., Lammi C., Zanoni C., Citterio A., Arnoldi, A. (2016) Proteomic characterization of hempseed (*Cannabis sativa* L.). *Journal of Proteomics* **147**: 187–196.
- Aluko R. E. (2017) Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Proteins: Composition, Structure, Enzymatic Modification, and Functional or Bioactive Properties. Sustainable Protein Sources. Sustainable Protein Sources, ScienceDirect str. 121-132.
- Butorac J. (2021) Predivo bilje. Repozitorij Agronomskog fakulteta u Zagrebu, str. 7-8.
- Brnčić M., Tripalo B., Penava A., Karlović D., Ježek D., Vikić Topić D., Karlović S., Bosiljkov T. (2009) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 32-37.
- Callaway J. C. (2004) Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*, **140**: 1–2, 65–72.
- Fetzer A., Herfellner T., Stäbler A., Menner M., Eisner P. (2018) Industrial Crops & Products Influence of process conditions during aqueous protein extraction upon yield from pre-pressed and cold-pressed rapeseed press cake. **112**(November 2017): 236–246.
- Habuš M. (2018) Utjecaj kriomljevenja na veličinu čestica i bioaktivne spojeve prosija prosa. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Hadnađev M., Dizdarević M., Dapčević-Hadnađev T., Jovanov P., Mišan A., Sakač M. (2018) Hydrolyzed hemp seed proteins as bioactive peptides. *Journal on Processing and Energy in Agriculture* **22(2)**: 90–94.
- Hadnadjev M., Dapcevic-Hadnadjev T., Pojic M., Saric B., Misan A., Jovanov P., Sakac M. (2017) Progress in vegetable proteins isolation techniques: A review. *Food and Feed Research* **44(1)**: 11–21.
- House J. D., Naufeld J., Leson G. (2010) Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 11801–11807.
- HRN EN ISO 665:2004, Uljarice - Određivanje količine vode i hlapljivih tvari, (osnovna referentna metoda).
- HRN EN ISO 659:2010, Uljarice - Određivanje udjela ulja (osnovna referentna metoda).
- HRN EN ISO 20483:2014 Žitarice i mahunarke -- Određivanje sadržaja dušika i proračun sadržaja sirovih proteina (osnovna referentna metoda).
- HRN EN ISO 12966-2:2017, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom - 2. dio: Priprava metilnih estera masnih kiselina (osnovna referentna metoda).
- Kostić M. (2017) Liquid nitrogen application for cryogenic grinding and obtaining fine powder of rubber, thermoplastics, spices or pharmaceutical products. *Zbornik Međunarodnog kongresa o procesnoj industriji- Processing* **23**: 2-5.

- Malomo S. A., He R., Aluko R. E. (2014) Structural and functional properties of hemp seed protein products. *Journal of Food Science* **79**: 1512–1521.
- Malomo S. A., Aluko R. E. (2015) A comparative study of the structural and functional properties of isolated hemp seed (*Cannabis sativa* L.) albumin and globulin fractions. *Food Hydrocolloids* **43**:743–752.
- Leonard W., Zhang P., Ying D., Fang Z. (2020) Hempseed in food industry: Nutritional value, health benefits, and industrial applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **19(1)**: 282–308.
- Ozanne L. (2014) Prospective sur la place des proteines v´eg´etales `a l'horizon 2030. Colloque: Les l´egumineuses `a graines en alimentation humaine < [https:// inra-dam-front-resources-cdn.brainsonic.com/ressources/afile/263281-db0a5-resource-prospective-sur-la-place-des-proteines-vegetales-a-horizon-2030.html](https://inra-dam-front-resources-cdn.brainsonic.com/ressources/afile/263281-db0a5-resource-prospective-sur-la-place-des-proteines-vegetales-a-horizon-2030.html)>
- Patel S., Cudney R., McPherson A. (1994) Crystallographic characterization and molecular symmetry of edestin, a legumin from hemp. *Journal of Molecular Biology* **235(1)** : 361-363
- Pojić M., Mišan A., Sakač M., HadnaCrossed D, Signev T. D., Šarić B., Milovanović I., HadnaCrossed D Signev M. (2014) Characterization of byproducts originating from hemp oil processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62(51)**.
- Pojić M., Mišan A., Tiwari B. (2018) Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *In Trends in Food Science and Technology* (Vol. 75).
- Potin F., Lubbers S., Husson F., Saurel R. (2019) Hemp (*Cannabis sativa* L.) Protein Extraction Conditions Affect Extraction Yield and Protein Quality. *Journal of Food Science* **84(12)**: 3682–3690.
- Roselló-Soto E., Barba F. J., Parniakov O., Galanakis C. M., Lebovka N., Grimi N., Vorobiev E. (2015) High Voltage Electrical Discharges, Pulsed Electric Field, and Ultrasound Assisted Extraction of Protein and Phenolic Compounds from Olive Kernel. *Food and Bioprocess Technology* **8(4)**: 885–894.
- Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation (2007) Protein and amino acid requirements in human nutrition. WHO Technical Report Series **935**: 135-152.
- Russin T. A., Arcand Y., Boye J. I. (2007) Particle size effect on soy protein isolate extraction. *Journal of Food Processing and Preservation* **31(3)**: 308-319.
- Sacilik K., Öztürk R., Keskin R. (2003) Some Physical Properties of Hemp Seed. *Biosystems Engineering* **86(2)**: 191–198.
- Scientific Opinion on the safety of hemp (*Cannabis* genus) for use as animal feed (2011). *EFSA Journal*, **9(3)**: 1–41.
- Tang C. H., Ten Z., Wang X. S., Yang X. Q. (2006) Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54(23)**: 8945–8950.
- 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 Chemistry* **114(4)**: 1484–1490.
- Technology F. (2016) Characterization and Antioxidant Properties of Hemp Protein Hydrolysates Obtained with Neutrase ® Characterization and Antioxidant Properties of Hemp Protein Hydrolysates Obtained with Neutrase ®. **47**(October 2009): 428–434.
- Teh S. S., Bekhit A. E. D., Carne A., Birch J. (2014) Effect of the defatting process, acid and alkali extraction on the physicochemical and functional properties of hemp, flax and canola seed cake protein isolates. *Journal of Food Measurement and Characterization* **8(2)**: 92–104.
- Wang S., Wang J., Xue F., Li C. (2019) Effects of heating or ultrasound treatment on the enzymolysis and the structure characterization of hempseed protein isolates. *Journal of Food Science and Technology* **56(7)**: 3337–3346.
- WHO & FAO Joint Expert Consultation Report, 1995: Fats and oils in human nutrition. *Nutr Rev* **53(7)**: 202–205.
- Wu G., Bazer F. W., Davis T. A., Kim S. W., Li P., Rhoads J. M., Satterfield M. C., Smith S. B., Spencer T. E., Yin Y. (2009) Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* **37**: 153–168.
- Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o suzbijanju zlouporabe droga (2019) Narodne novine **39** (NN 39/2019).
- Zhou Y., Danbolt N. C. (2014) Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of Neural Transmission* **121**: 799–817.



## Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Petra Pišanić

ime i prezime studenta