

# Analiza funkcionalnih svojstava izolata proteina boba

---

**Dautanec, Tena**

**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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:295162>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-20**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Tena Dautanec

**ANALIZA FUNKCIONALNIH  
SVOJSTAVA 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 te uz pomoć Josipe Dukić, mag. ing.

*Za početak, zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak na pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada, na strpljenju i dostupnosti u svakom trenutku te asistentici Josipi Dukić, mag. ing., na savjetima i pomoći tijekom rada.*

*Veliko hvala svim prijateljima i kolegama koji su moje studentske dane uspjeli učiniti nezaboravnima, a najveća hvala mojim roditeljima, sestri i dečku koji su bili moja najveća podrška čak i u najtežim trenucima, koji su me gurali dalje kad sam mislila da dalje više ne mogu i bez kojih ovo do sad ostvareno ne bi bilo moguće.*

# 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

## ANALIZA FUNKCIONALNIH SVOJSTAVA IZOLATA PROTEINA BOBA

*Tena Dautanec*, univ. bacc. ing. techn. aliment.  
0058211564

### Sažetak:

Porastom svjetske populacije sve više raste zabrinutost vezana za količinu hrane dostatne da prehrani cijeli svijet, a osim toga sve se češće čuje i zabrinutost oko globalnog zatopljenja. Iz tih se razloga, a i zbog brige za zdravlje, sve više ljudi okreće prehrani baziranoj na biljnim proteinima umjesto životinjskih proteina. Cilj ovog rada bio je analizirati funkcionalna svojstva izolata proteina boba, jednog od potencijalnih kandidata koji bi zamijenio životinjske proteine, pri različitim pH vrijednostima, sa svrhom njegovog korištenja u prehrambenim proizvodima kao alternativa proteinima životinjskog porijekla. Određena je topljivost proteina, njihova sposobnost emulgiranja mogućeg i pjenjenja te zadržavanja vode. Rezultati su pokazali da dobivene vrijednosti uvelike ovise o pH suspenzije te bi se, pri određenim pH vrijednostima, bob mogao koristiti kao dodatak nekim prehrambenim proizvodima.

**Ključne riječi:** *Vicia faba* L., funkcionalna svojstva, topljivost, pjenjenje, emulgiranje, zadržavanje vode

**Rad sadrži:** 43 stranica, 16 slika, 5 tablica, 40 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

**Pomoć pri izradi:** Josipa Dukić, mag. ing.

**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:**

## 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

ANALYSIS OF FUNCTIONAL PROPERTIES OF FABA BEAN PROTEIN ISOLATES

*Tena Dautanec*, univ. bacc. ing. techn. aliment.  
0058211564

### **Abstract:**

With the increase in the world's population, concerns about the amount of food sufficient to feed the entire world are growing, and in addition, concerns about global warming are increasingly being heard. For these reasons, and also because of health concerns, more and more people are turning to a diet based on plant proteins instead of animal proteins. The aim of this work was to analyse the functional properties of bean protein isolate, one of the potential candidates that would replace animal proteins, at different pH values, with the purpose of its possible use in plant-based products. 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 suspension and, at certain pH values, beans could be used as a supplement to some food products.

**Keywords:** *Vicia faba* L., functional properties, solubility, foaming, emulsification, water retention

**Thesis contains:** 43 pages, 16 figures, 5 tables, 40 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

**Technical support and assistance:** Josipa Dukić, MSc

### **Reviewers:**

1. Mojca Čakić Semenčić, PhD (President)
2. Anet Režek Jambrak, PhD (Mentor)
3. Sven Karlović, PhD (Member)
4. Filip Šupljika, PhD (Substitute)

**Thesis defended:**

## Sadržaj:

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 2. TEORIJSKI DIO.....   | 2  |
| 2.1. PORIJEKLO BOBA.....                                      | 2  |
| 2.2. BOTANIČKA OBILJEŽJA .....                                | 2  |
| 2.3. UPOTREBA BOBA .....                                      | 3  |
| 2.3.1. Upotreba boba u prehrani .....                         | 3  |
| 2.3.2. Upotreba boba u medicini .....                         | 4  |
| 2.4. SASTAV I NUTRITIVNI PROFIL BOBA .....                    | 4  |
| 2.4.1. Proteini .....   | 5  |
| 2.4.2. Ugljikohidrati (šećeri, škrob, dijetalna vlakna) ..... | 6  |
| 2.4.3. Vitamini i minerali .....                              | 7  |
| 2.4.4. Bioaktivne komponente.....                             | 7  |
| 2.5. PROIZVODI OD BOBA.....                                   | 7  |
| 2.5.1. Tjestenina .....                                       | 8  |
| 2.5.2. Kruh.....  | 8  |
| 2.5.3. Tofu i jogurt .....                                    | 8  |
| 2.5.4. Izolati proteina i drugi proizvodi.....                | 9  |
| 2.6. PROTEINI.....  | 9  |
| 2.6.1. Biljni proteini u odnosu na životinjske proteine ..... | 10 |
| 2.6.2. Struktura proteina .....                               | 11 |
| 2.6.3. Funkcionalna svojstva proteina .....                   | 12 |
| 2.6.4. Topivost proteina.....                                 | 13 |
| 2.6.5. Stabilizirajuća i emulgirajuća svojstva proteina.....  | 14 |
| 2.6.6. Kapacitet vezanja vode.....                            | 14 |
| 2.6.7. Kapacitet pjenjenja i stabilnost pjene.....            | 15 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....                                  | 16 |
| 3.1. MATERIJALI.....  | 16 |
| 3.1.1. Uzorak .....   | 16 |
| 3.1.2. Kemikalije .....                                       | 16 |
| 3.1.3. Aparatura.....   | 17 |
| 3.1.4. Pribor.....  | 17 |
| 3.2. METODE.....  | 18 |
| 3.2.1. Ispitivanje topljivosti proteina.....                  | 18 |



|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.2.2. | Kapacitet i stabilnost pjenjenja.....            | 19 |
| 3.2.3. | Određivanje svojstava emulgiranja proteina ..... | 20 |
| 3.2.4. | Određivanje kapaciteta vezanja vode .....        | 21 |
| 4.     | REZULTATI I RASPRAVA .....                       | 23 |
| 4.1.   | ISPITIVANJE TOPLJIVOSTI PROTEINA .....           | 23 |
| 4.2.   | KAPACITET I STABILNOST PJENJENJA.....            | 26 |
| 4.3.   | ODREĐIVANJE SVOJSTAVA EMULGIRANJA PROTEINA ..... | 32 |
| 4.4.   | ODREĐIVANJE KAPACITETA VEZANJA VODE .....        | 35 |
| 5.     | ZAKLJUČCI.....                                   | 38 |
| 6.     | LITERATURA .....                                 | 40 |

# 1. UVOD

Potaknuti sve većom brigom kako za okoliš tako i za vlastito zdravlje, sve se više ljudi okreće biljnoj prehrani koja podrazumijeva konzumaciju minimalno procesiranog voća i povrća, mahunarki, bilja, začina, orašastih plodova i sjemenki te žitarica pri čemu su iz prehrane isključene sve namirnice životinjskog porijekla kao što su perad, crveno meso, riba, jaja te mliječni proizvodi (Ostfeld, 2017). U usporedbi sa proteinima životinjskog porijekla, proteini biljnog porijekla imaju mnoge različite učinke na rizik nastanka kardiovaskularnih bolesti. Odnos proteina i zdravlja prvi put je obrađen 2010. godine u pregledu dokaza Savjetodavnog odbora za smjernice o prehrani pri čemu je primarna preporuka Prehrambenih smjernica za Amerikance bila veći unos hrane biljnog porijekla, bazirajući se prvenstveno na cjelovite žitarice, orašaste plodove, sjemenke, povrće te grah odnosno mahunarke, a sve su te skupine namirnica izvor biljnih proteina. Iako su se nekad biljni proteini smatrali nepotpunim izvorima esencijalnih aminokiselina te manje hranjivima u odnosu na proteine životinjskog porijekla, danas su oni prihvaćeni kao zdrava opcija za zadovoljavanje dnevnih preporuka i potreba za proteinima (Richter i sur., 2015).

Grah bob (*Vicia faba* L.) spada među najstarije usjeve na svijetu te je treća najvažnija mahunarka stočnog zrna nakon soje (*Glycine max* L.) i graška (*Pisum sativum* L.). Dobar je izvor lizinom bogatih proteina i levadope (*L-dopa*) koja je prekursor dopamina koji pokazuje potencijal u liječenju Parkinsonove bolesti. Bob predstavlja usjev koji, u teoriji, pokazuje najbolje rezultate u scenariju već postojećih klimatskih promjena i globalnog zatopljenja jer ima sposobnost nadilaženja gotovo svih vrsta klimatskih uvjeta te vrlo dobru prilagodbu na tlo. Unatoč svojim izvrsnim svojstvima kao hrana, u nekim je dijelovima svijeta, primjerice u Indiji, bob još uvijek nedovoljno iskorišten usjev iako se smatra agronomski održivom alternativom žitarica (Singh i sur., 2013).

Cilj ovog rada bio je ispitati funkcionalna svojstva izolata proteina boba kako bi se, u bližoj budućnosti, protein boba mogao uklopiti u određene prehrambene proizvode te kako bi se pokazao kao dobra alternativa proteinima životinjskog porijekla.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PORIJEKLO BOBA

Grah bob jednogodišnja je mahunarka botaničkog naziva *Vicia faba* L. Spada među najstarije usjeve na svijetu te je treća najvažnija mahunarka za stočnu hranu po proizvodnji i površini uzgoja. Zelene mahune boba koriste se uglavnom kao povrće, no njegovi suhi kotiledoni predstavljaju dobar izvor lizinom bogatih proteina za siromašne. Uz lizin, bob je dobar izvor levadope, prekursora dopamina sa potencijalom korištenja u liječenju Parkinsonove bolesti (Singh i sur., 2013).

Vjeruje se da bob potječe iz sjeverne Afrike i jugozapadne Azije, a sada pripada središnjim azijskim, mediteranskim i južnoameričkim središtima. Korišten je u kineskoj prehrani prije gotovo 5000 godina, Egipćani su ga uzgajali prije 3000 godina, Hebreji u biblijsko doba, a Grci i Rimljani nešto kasnije. Pretpostavlja se da su ga u Indiju unijeli Europljani tijekom sultanskog razdoblja (1206.-1555.) tijekom kojeg se spominje njegov uzgoj kao vrtne kulture. No ipak, točno porijeklo graha boba još uvijek je nepoznato. Postoji nekoliko divljih vrsta (*Vicia narbonensis* L. i *V. galilaea* Plitmann i Zohary) koje su taksonomski povezane sa kultiviranim usjevima, no broj kromosoma im se razlikuje – divlje vrste sadrže  $2n = 14$  kromosoma, a kultivirani grah bob ima  $2n = 12$  kromosoma. Iako se bob uglavnom svrstava u rod *Vicia* kao grahorica, brojni je botaničari tretiraju kao zaseban monotipski rod – *Faba sativa* Moench (Singh i sur., 2013).

### 2.2. BOTANIČKA OBILJEŽJA

*Vicia faba* jednogodišnja je zeljasta biljka sa grubim i uspravnim stabljikama. Nerazgranata je te može narasti 0,3 – 2 metra visine. Ima naizmjenične, peraste listove koji se sastoje od 2 do 6 listića od kojih svaki može biti dužine do 8 cm za razliku od većine drugih članova tog roda. Biljka posjeduje rudimentarne vitice ili je bez vitica. Sama biljka vrlo obilno cvjeta, no samo mali broj nastalih cvjetova ima sposobnost stvaranja mahune. Cvjetovi su veliki, bijele su boje sa tamnoljubičastim oznakama te su smješteni na kratkim peteljka u grozdovima od 1 do 5. Iz svakog se cvjetnog grozda razvijaju 1 – 4 mahune (slika 1). U jednoj populaciji je oko 30% biljaka unakrsno oplodeno, a kukci koji su glavni za oprašivanje su bumbari. *V. faba* je diploidna te ima 12 kromosoma odnosno 6 homolognih parova od kojih je jedan metacentričan, a ostali su akrocentrični (Singh i sur., 2013).



**Slika 1.** *Vicia faba L.* (Anonymus, 2022)

## **2.3. UPOTREBA BOBA**

### **2.3.1. Upotreba boba u prehrani**

U zemljama u razvoju, bob se koristi kao hrana za ljude dok se u industrijaliziranim zemljama uglavnom koristi kao stočna hrana za konje, svinje, perad i golubove. Može se konzumirati kao povrće – zeleno ili osušeno te svježe ili konzervirano. Na Bliskom istoku, mediteranskoj regiji, Etiopiji i Kini, bob je uobičajena hrana za doručak. Koristi se u izradi mnogih jela od kojih su najpopularnija Medamis (pirjani bob), Falafel (duboko pržena pasta od kotiledona sa povrćem i začinima), Bissara (tijesto od kotiledona) te Nabet juha (kuhani proklijali bob). Bob ima visoku prehrambenu vrijednost te se na nekim područjima smatra superiornijim od graška i ostalih mahunarki. Jedan je od najvažnijih zimskih usjeva korištenih za ljudsku prehranu na Bliskom istoku, a ponegdje se smatra i nadomjestkom za meso ili obrano mlijeko. Kao povrće koriste se krupnosjemeni kultivari, dok se pržene sjemenke boba u Indiji jedu poput kikirikija. Osim upotreba u prehrambene svrhe, slama iz žetve boba može se koristiti za izradu cigle te kao gorivo u nekim dijelovima Sudana i Etiopije (Singh i sur., 2013).

### 2.3.2. Upotreba boba u medicini

Osobe oboljele od Parkinsonove bolesti ne mogu sintetizirati dopamin koji je odgovoran za regulaciju motoričkih stanica. Bob je dobar izvor levandope (L-dopa) koja je prekursor dopamina te kao takav ima potencijal u liječenju osoba oboljenih od Parkinsonove bolesti. Osim toga, L-dopa je i natriuretik te bi mogao pomoći u kontroli hipertenzije. Također, neki ljudi koriste bob kao prirodnu alternativu lijekovima poput Viagre, povlačeći paralelu između ljudskog libida te proizvodnje L-dope. Konzumacija nezrelog boba može izazvati zatvor te simptome slične žutici pa se ne preporuča njihova konzumacija od strane male djece (Singh i sur., 2013).

## 2.4. SASTAV I NUTRITIVNI PROFIL BOBA

Grah bob važna je mahunarka bogata raznim hranjivim tvarima – lizinom bogatim proteinima, dijetalnim vlaknima, složenim ugljikohidratima, mnogim bioaktivnim spojevima (antioksidansi, fenoli,  $\gamma$ -aminomaslačna kiselina), mikro- i makroelementima te mineralima. U Tablici 1 prikazan je sastav kuhanog i sirovog te zrelog i nezrelog boba (Dhull i sur., 2021).

**Tablica 1.** Sastav boba

|                |          | NEZRELI BOB |                     | ZRELI BOB |                     |
|----------------|----------|-------------|---------------------|-----------|---------------------|
| SASTOJAK       | JEDINICA | SIROVI      | KUHANI<br>(sa soli) | SIROVI    | KUHANI<br>(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          | $\mu$ g  | 96          | 58                  | 423       | 104,1               |
| Vitamin A      | IU       | 350         | 270                 | 53        | 15,0                |

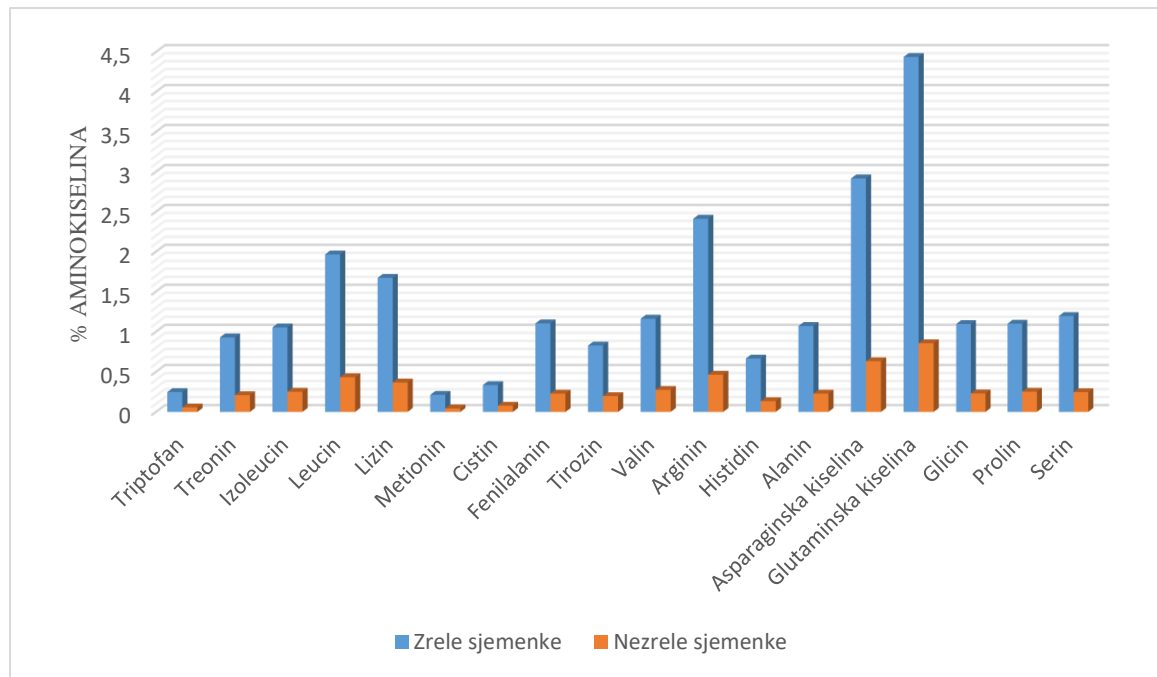
**Tablica 1.** Sastav boba - nastavak

| SASTOJAK | JEDINICA | NEZRELI BOB |                     | ZRELI BOB |                     |
|----------|----------|-------------|---------------------|-----------|---------------------|
|          |          | SIROVI      | KUHANI<br>(sa soli) | SIROVI    | KUHANI<br>(sa soli) |
| 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                 |

#### 2.4.1. Proteini

U usporedbi sa žitaricama, bob sadrži gotovo dvostruko više proteina koji se kreće od 20 % pa sve do 41 %. Velike varijacije mogu biti posljedica razlika u sortama, metodama gnojidbe, sezoni rasta pa čak i mjestu sadnje. Provedena su brojna istraživanja o povećanju dostupnosti, iskoristivosti te razgradivosti proteina boba u kojima je dokazano kako je ljuštenje značajno poboljšalo sadržaj proteina boba, a klijanje, namakanje i ekstruzija su imale minimalan utjecaj. Od toplinskih obrada, najbolji postupak za poboljšanje razgradivosti proteina bilo je tostiranje pod pritiskom. Sama toplinska obrada te obrada pod visokim pritiskom nisu imale utjecaja na *in vitro* probavljivost proteina kao ni na njihovu kvalitetu. Ipak, obrada pod visokim pritiskom rezultirala je nešto većom želučanom probavljivošću od kontrole te većom želučanom proteolizom od toplinske obrade. Glavni skladišni proteini u bobu su legumin i vicilin, oboje složenih kemijskih struktura te velikih molekularnih masa. Njihov omjer ima važnu ulogu u fiziološkim funkcijama i funkcionalnim svojstvima mahunarki. Zbog svojeg visokog sadržaja proteina, bob se koristi u prehrambenoj industriji za obogaćivanje sadržaja proteina u drugim prehrambenim proizvodima (keksi, kruh, emulzije tipa ulje u vodi).

Aminokiselinski sastav boba značajno varira između zrelih i nezrelih sjemenki, a uključuje esencijalne aminokiseline (izoleucin, leucin, lizin, metionin, tirozin, fenilalanin, valin, histidin, triptofan i treonin) te neesencijalne aminokiseline (asparaginsku kiselinu, glutaminsku kiselinu, alanin, arginin, glicin, prolin i serin). Osim o zrelosti sjemenke, aminokiselinski sastav boba ponajviše ovisi o sorti boba (Dhull i sur., 2021) (slika 2).



**Slika 2.** Aminokiselinski sastav zrelih i nezrelih sjemenki boba

#### 2.4.2. Ugljikohidrati (šećeri, škrob, prehrambena vlakna)

Udio ugljikohidrata u bobu je 51 % - 68 % od čega najveći udio predstavlja škrob, 41 % - 58 %. Glavni topivi šećeri u bobu su oligosaharidi. Oni su odgovorni za nadutost te ograničavanje unosa boba sa gledišta probave. Također, bob je vrlo bogat izvor škroba (čije su dvije glavne komponente amilopektin te amiloza), te topivih i netopivih prehrambenih vlakana. Pronađen je veći udio prehrambenih vlakana u brašnu od boba u usporedbi sa brašnom od lima, pinto i crvenog graha. Udio prehrambenih vlakana u bobu kreće se između 15 % i 30 % pri čemu je glavna komponenta hemiceluloza uz celulozu i lignin. U ovojnici boba pronađena je veća količina prehrambenih vlakana nego u endospermu te se stoga preporuča unos boba zajedno sa omotačem sjemena jer on sadrži, osim visokog udjela prehrambenih vlakana, veliku količinu fenolnih spojeva i mineralnih tvari (Dhull i sur., 2021).

### 2.4.3. Vitamini i minerali

Bob je dobar izvor velikog broja različitih minerala prikazanih u tablici 1. Nizak udio natrija uz visok udio kalija u sjemenu graha zrelog boba idealan je za osobe na dijeti sa niskim udjelom natrija, a isto tako i za osobe koje pate od hipertenzije. Također, bob je dobar izvor folata koji je nužan za sintezu pirimidina, purina te aminokiselina. Većina fosfora pronađenog u bobu postoji u obliku fitata koji su odgovorni za štetne učinke na ljudsko zdravlje te je stoga kao takav nedostupan (Dhull i sur., 2021).

### 2.4.4. Bioaktivne komponente

U bobu je identificirano više različitih bioaktivnih komponenti kao što su fenolni spojevi, lignani, flavonoidi te terpenoidi. Od fenolnih spojeva prisutni su i slobodni i esterificirani oblici, npr. protokatehuinska kiselina, ferulinska kiselina, vanilin kiselina, sinapinska kiselina, *cis*- i *trans*-*p*-kumarinska kiselina i druge. U ekstraktu mahuna boba različitih sorti, ukupni sadržaj fenola bio je u rasponu od 4,8 do 13 mg ekvivalenata galne kiseline (GAE/g) s time da količina fenolnih spojeva varira u pojedinim dijelovima boba. Tako primjerice cijelo zrno boba sadrži 2,9 mg GAE/g ukupnih fenola, dok ih u ovojnici sjemena ima 22,5 mg GAE/g. Bioaktivni spojevi flavonoidi imaju antidijabetička i protuupalna svojstva. Antioksidativna aktivnost također varira ovisno o dijelu boba. Tako je antioksidativna aktivnost u cijelom sjemenu boba tek 1,8 mg Trolox ekvivalenta (TE/g) dok ovojnica pokazuje aktivnost od 22,9 mg TE/g (Dhull i sur., 2021).

## 2.5. PROIZVODI OD BOBA

Bob ima široku upotrebu u prehrani. Osim što se sam može konzumirati kao hrana, može se i koristiti u proizvodnji nekih drugih proizvoda bogatih hranjivim tvarima. Tako se primjerice brašno od boba te izolati proteina i škroba mogu koristiti u proizvodnji tjestenine, kruha, tofua, jogurta, a može služiti i kao zamjena za meso u pljeskavicama ili kao zamjena žumanjka u majonezi. Bob je zbog svojeg visokog udjela proteina preferiran u odnosu na ostale mahunarke, a to proizvođačima omogućava da proteinski prah od boba ili brašno od boba iskoriste u proizvodnji drugih prehrambenih proizvoda sa dodatkom proteina, tako se brašno od boba pokazalo kao odlično u proizvodnji tjestenine, peciva i kruha zbog povećanja udjela proteina u gotovom proizvodu. Ako se u proizvodnji kruha pšenično brašno zamijeni sa 30 % brašna od boba, dolazi do porasta udjela proteina za 11,6 – 16,5 %, a jednaka situacija je i prilikom



proizvodnje tjestenine gdje se, osim koncentracije proteina, povećá i udio vlakana što povoljno utječe na fizikalno-kemijska te senzorska svojstva. Proteini boba imaju izvrsna ekspanzivna svojstva što ih čini pogodnima za proizvodnju ekstrudiranih proizvoda, žitarica za doručak te čipsa (Chiremba i sur., 2018).

### 2.5.1. Tjestenina

Tazart i sur. (2016) pripremili su svježú tjesteninú od krupice obogaćenu sa 10 %, 30 % i 50 % brašna od boba. Takva je tjestenina pokazala kraće vrijeme kuhanja u odnosu na neobogaćenu tjesteninú, ali je uočen veći gubitak suhe tvari. U tjestenini obogaćenoj brašnom od boba uočen je porast razine proteina, vlakana i minerala (kalcij, cink, željezo). U drugom istraživanju provedenom iste godine, Rosa-Sibakov i sur. (2016) proučavali su učinke prerađenog brašna od boba na senzorska, strukturna te teksturna svojstva tjestenine bez glutena pripremljene od brašna od boba, frakcije brašna od boba bogate škrobom ili fermentiranog brašna od boba. U usporedbi sa kontrolnom tjesteninom od griza, tjestenina pripremljena od fermentiranog brašna od boba ili brašna od boba pokazala je veći gubitak prilikom kuhanja te manju apsorpciju vode. Što se tiče teksture, tekstura tjestenine sa brašnom od boba bila je usporediva sa teksturom kontrolne tjestenine, dok je fermentacija nepovoljno utjecala na teksturu tjestenine te je uzrokovala većú tvrdoću i smanjenu sposobnost žvakanja.

### 2.5.2. Kruh

Kod pripreme kruha bez glutena, ispitivan je učinak fermentacije mliječne kiseline kao proces povećanja hranjivih tvari u brašnu od boba pri čemu je kvaliteta takvog kruha uspoređivana sa kvalitetom kruha od sojinog brašna (Sozer i sur., 2019). U usporedbi sa kruhom od sojinog brašna, i fermentirani i nefermentirani kruh od brašna od boba imali su većú poroznost. Što se tiče senzorskih procjena, pokazalo se kako je fermentacija imala minimalan učinak na elastičnost krušnih mrvica, mrvljivost te ravnomjernost veličine pora, no zato je nutritivni indeks povećan sa 33 na 36.

### 2.5.3. Tofu i jogurt

Jiang i sur. (2020.) su pripremili dvije emulzijske gel namirnice na bazi proteina od boba, odnosno analogne proizvode od jogurta i tofua. Takvi proizvodi zahtijevali su prethodnu obradu

zrna boba, a ona je uključivala termičku prethodnu obradu zrna, ljuštenje, mljevenje, dodavanje biljnog ulja, homogenizaciju, sprječavanje geliranja škroba te induciranje geliranja proteina. Metode korištene za sprječavanje geliranja škroba bile su uklanjanje škroba te hidroliza škroba te su obje korištene metode dale tofu odnosno jogurt sa tipičnim svojstvima emulzijskog gela. Kod proizvodnje jogurta, nešto boljom metodom se ipak pokazala hidroliza škroba budući da hidrolizati poboljšavaju čvrstoću gela i viskoznost proizvoda. S druge strane, u proizvodnji tofua se uklanjanje škroba pokazalo kao bolja opcija jer su hidrolizati smanjili kapacitet zadržavanja vode i jačinu gela tofua.

#### 2.5.4. Izolati proteina i drugi proizvodi

Singhal i sur. (2016.) pripremili izolate proteina boba sa udjelom proteina od 94%. Izolati su pripremljeni korištenjem alkalne ekstrakcije i izoelektričnog taloženja iz sedam genotipova. Potom su analizirana neka funkcionalna svojstva izolata – topljivost, stabilnost emulgiranja, kapacitet pjenjenja, stabilnost emulzije te kapacitet zadržavanja ulja te je dokazano da se funkcionalna svojstva izolata proteina boba mogu uspoređivati sa funkcionalnim svojstvima komercijalno dostupnih izolata iz graška, soje, jaja ili sirutke.

2018. godine Felix i suradnici pripremili su proteinske koncentrate pogodne za razvoj prehrambenih emulzija čija je mikrostruktura ovisna o pH. Najbolji rezultati (mala veličina kapljica i velika viskoelastična svojstva) postignuta su pri pH od 2,5 zbog razvoja odgovarajuće proteinske mreže pri ovom pH. S druge strane, pri pH 8,0 opažen je vrlo loš reološki odgovor zbog niske topljivosti proteina pri visokom pH. Pri pH 5,0 rezultati raspodjele veličine kapljica pokazali su nedostatak površinskog naboja proteina te je to dovelo do visokog indeksa zgrušavanja (Dhull i sur., 2021).

## 2.6. PROTEINI

Jedan od najvažnijih sastojaka ljudske prehrane su proteini iz hrane zbog svog nutritivnog doprinosa te ostalih specifičnih funkcija. U zemljama u razvoju, značajnu ulogu igraju biljni proteini budući da je prosječni unos proteina u tim zemljama manji od potrebnog. Proizvodi od biljnih proteina u zadnje vrijeme imaju sve veći značaj u cijelome svijetu, a konačni uspjeh u njihovom korištenju u prehrambenim proizvodima ponajviše ovisi o okusu i drugim karakteristikama koje daju hrani. (Mao i Hua, 2012).

Suvremenim tržištem trenutno dominiraju proteini mlijeka, pšenice i soje no zbog sve veće potražnje te nesigurne opskrbe proteinima iz konvencionalnih izvora, sve se više istražuju razni nekonvencionalni izvori proteina u pogledu samog sadržaja proteina, njihove funkcionalnosti te potencijalne primjene. Nekoliko je različitih čimbenika koji određuju stvarnu potražnju za novim funkcionalnim proteinima, a to su cijena, dostupnost, njihova prikladnost da budu ugrađeni u nove proizvode, no ono najvažnije su njihova funkcionalna svojstva. Raznolika funkcionalnost proteina u najvećoj je mjeri povezana sa njihovom heterogenom strukturom i vrstama interakcija sa drugim komponentama hrane, npr. polisaharidima, šećerima ili lipidima. Površinske karakteristike svakog pojedinog proteina te njegov oblik i veličina odgovorni su za jedinstvenu funkcionalnost proteina. (Haque i sur., 2016). Većina prehrambenih proteina koji se danas konzumiraju su biljnog (oko 65 %) ili životinjskog (oko 35 %) porijekla, no u zadnje vrijeme sve se češće na tržištu mogu vidjeti i proteini mikroba i algi.

#### 2.6.1. Biljni proteini u odnosu na životinjske proteine

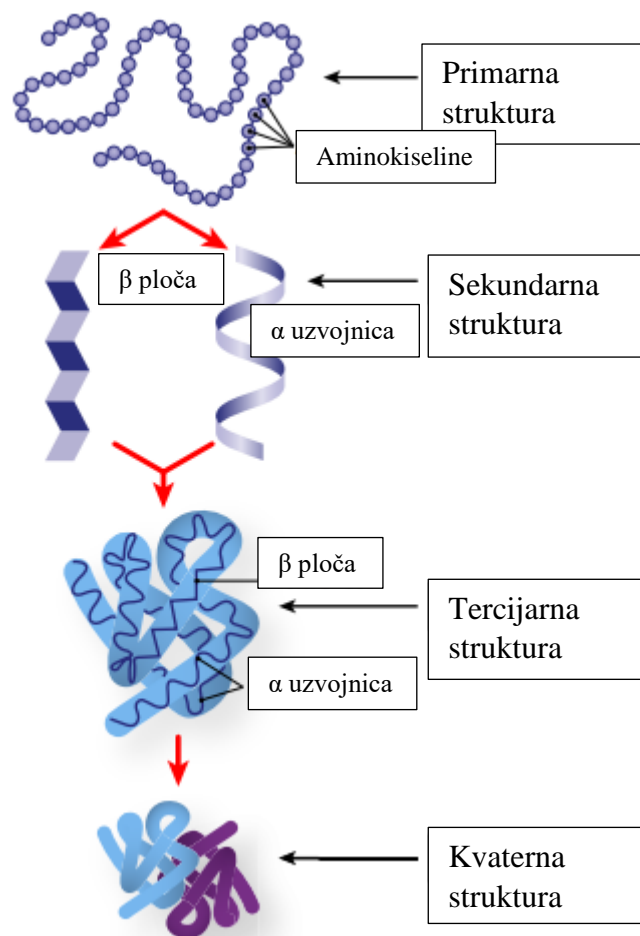
Usporedbom biljnih i životinjskih proteina, proteini životinjskog porijekla predstavljaju se kvalitetnijima od proteina biljnog porijekla, no za njihovo dobivanje (uzgoj stoke) negativan je i sve veći utjecaj na okoliš te je potrebno u čim većoj mjeri se okrenuti održivom razvoju. Biljni proteini nemaju toliki utjecaj na okoliš te bi mogli predstavljati jedinstveno rješenje tog problema. Nedostaci vezani za proteine biljnog porijekla su manja probavljivost u odnosu na životinjske proteine te nedostatak esencijalnih aminokiselina, no oni se mogu riješiti kombiniranjem više različitih izvora proteina.

Uzgojem životinja za prehranu, prvenstveno stoke, nastaje velika količina stakleničkih plinova, prvenstveno dušikovog oksida i metana, što ima loš utjecaj na ionako već zagrijan planet. I metan i dušikov oksid nastaju skladištenjem stajskog gnoja te imaju puno veći utjecaj na globalno zagrijavanje od ugljikovog dioksida. Najveći 'zagađivači' što se tiče emisije stakleničkih plinova u životinja su goveda sa oko 5 gigatona ekvivalenata CO<sub>2</sub> godišnje što je oko 62 % ukupne emisije uzrokovane uzgojem stoke (Božić, 2021). Drugi važan razlog zamjene životinjskih proteina biljnima jesu sve češće pojave alergija na neke komponente životinjskih proizvoda. Tako primjerice 2 – 7 % djece mlađe od 3 godine ima razvijenu alergiju na proteine kravljeg mlijeka, a osim toga postoje i oni alergični na šećer u mlijeku – laktozu. Iz tog je razloga od iznimne važnosti napraviti biljne alternative za kravlje mlijeko koje se posljednjih godina u sve većoj mjeri mogu vidjeti na policama trgovina. Osim alternativa za

mlijeko, od velikog su interesa i zamjene ili nadomjesti mesa. Vrlo se često takvi proizvodi predstavljaju kao "zdravija" hrana, a posljednjih je godina vidljiv trend rasta istraživačkih radova na temu zamjena mesa (Mariotti, 2017).

### 2.6.2. Struktura proteina

Proteini imaju vrlo složenu kemijsku strukturu. Građeni su od aminokiselina i svi proteini, bez obzira na njihovo porijeklo, sadrže 20 aminokiselina. Aminokiseline su organski spojevi građeni od karboksilne skupine (COOH-), amino skupine (NH<sub>2</sub>) te bočnog lanca (R). Upravo taj bočni lanac čini razliku između pojedinih aminokiselina. Kemijskim povezivanjem dviju aminokiselina nastaje dipeptid, a vezanjem više aminokiselina nastaje polipeptid. Vezanjem više polipeptidnih lanaca nastaje trodimenzionalna struktura poznata kao proteinska jedinica. Svaki protein u prostoru zauzima nativnu konformaciju koja predstavlja termodinamičko ravnotežno odnosno najpovoljnije stanje u kojem je slobodna energija molekule najniža. Tako definirana trodimenzionalna struktura ima četiri različite razine strukture: primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvaternu. Primarnu strukturu predstavlja polipeptidni lanac u kojem je niz aminokiselina kovalentno povezan tvoreći peptidne veze između amino i karboksilne skupine. Kod sekundarne strukture aminokiseline se organiziraju u stabilnije strukture –  $\alpha$ -uzvojnice,  $\beta$ -zavoje i  $\beta$ -nabrane ploče, povezujući se vodikovim vezama između amidnih skupina. U tercijarnoj se strukturi polipeptidi savijaju u trodimenzionalne oblike pri čemu vrlo važnu ulogu imaju kovalentne i nekovalentne veze kao što su hidrofobne interakcije te vodikove i disulfidne veze. Kvaternu strukturu čini nekoliko proteinskih molekula koje zajedno funkcioniraju kao jedan proteinski kompleks (Awuchi i sur., 2019).



**Slika 3.** Četiri razine strukture proteina (prema Awuchi i sur., 2019)

### 2.6.3. Funkcionalna svojstva proteina

Funkcionalna svojstva predstavljaju osnovna fizikalno-kemijska svojstva hrane kojima se odražavaju složene interakcije između struktura, molekularnih konformacija, sastava te fizikalno-kemijskih komponenti hrane sa uvjetima u kojima se mjere i povezuju. Funkcionalne karakteristike su potrebne kako bi se moglo predvidjeti i procijeniti kako bi se neki proteini, ugljikohidrati, masti ili vlakna mogli ponašati u nekim prehranbenim sustavima te mogu li se kao takvi koristiti kao zamjena za konvencionalne proteine, masti, vlakna ili ugljikohidrate. Osim toga, funkcionalna svojstva opisuju ponašanje tog sastojka prilikom pripreme ili kuhanja te njegov utjecaj na gotov prehranbeni proizvod u smislu teksture, izgleda ili okusa. Funkcionalna svojstva uključuju kapacitet bubrenja, kapacitet vezanja vode, kapacitet vezanja ulja, aktivnost emulzije, stabilnost emulzije, kapacitet pjene, stabilnost pjene, želatinizaciju,

nasipnu gustoću, konzerviranje, denaturaciju, koagulaciju, stvaranje glutena, geliranje, plastičnost, zadržavanje vlage, senzorska svojstva i mnoge druge (Awuchi i sur., 2019).

#### *2.6.3.1. Funkcionalna svojstva proteina boba*

U istraživanju provedenom 2021. godine, Keivaninahr i suradnici su dokazali da, u usporedbi sa proteinima sirutke koji su gotovo 100 % topljivi u vodi, proteini mahunarki imaju poprilično nisku topljivost pa stoga neće biti učinkoviti u procesu emulgiranja, stvaranja pjene ili otapanja. Osim toga, proteini mahunarki, u ovom slučaju boba, imaju veći udio hidrofobnih dijelova na površini molekule proteina pa se zbog toga neće dobro dispergirati u vodenim otopinama. Povećanjem koncentracije proteina povećava se i njegova sposobnost emulgiranja. Mortuza i sur. (2009.) proveli su istraživanje u kojem su dokazali da je kapacitet vezanja vode proteina boba sličan kapacitetu vezanja vode drugih mahunarki, što znači da se proteini boba mogu koristiti u raznim prehrambenim proizvodima. Osim toga, dokazali su da je sposobnost pjenjenja kao i stabilnost stvorene pjene proteina boba nešto viša nego kod drugih mahunarki.

#### 2.6.4. Topljivost proteina

Topljivost je vrlo važno svojstvo mnogih tvari, a posebice lijekova. Mnogi proteini i polipeptidi su vrlo slabo topivi dok membranski proteini uopće nisu topivi. Topljivost proteina u vodenom mediju ponajviše ovisi o tome koliko su interakcije protein-voda dominantne nad interakcijama protein-protein, a izražava se kao postotak proteina u vodenoj otopini koji nije sedimentiran djelovanjem umjerenih centrifugalnih sila. Razlikujemo dva različita načina ponašanja proteina u otopini – topljivost i agregacija. Topljivost se definira kao koncentracija u kojoj je intaktni protein u ravnoteži sa čvrstom fazom, dok se kod agregacije molekule proteina međusobno vežu tvoreći netopljive oblike velikih molekularnih masa (Vihinen, 2020).

Topljivost proteina se smatra jednim od najvažnijih funkcionalnih svojstava proteina budući da ima utjecaj na boju, teksturu, pjenjenje, emulgiranje, ali i senzorska svojstva prehrambenih proizvoda. Drugim riječima, proteini moraju biti topljivi kako bi mogli biti primijenjeni u nekim prehrambenim proizvodima. Osim toga, topljivost proteina utječe i na zadržavanje vode te na druga fizikalno-kemijska i funkcionalna svojstva hrane. Ona predstavlja glavni parametar kojim se određuje prikladnost proteina u pićima i tekućoj hrani te je poželjan visok stupanj topljivosti kako bi se postigao željeni stupanj emulgiranja, pjenjenja i geliranja. Sama topljivost proteina

ovisi o sastavu aminokiselina, molekularnoj masi, pH vrijednosti okoliša u kojem se nalaze, temperaturi te ionskoj jakosti. Minimalna topljivost proteina je kod njegove izoelektrične točke (pI). Denaturacijom proteina dolazi do smanjenja njegove topljivosti budući da dolazi do promjena na sekundarnoj i tercijarnoj strukturi pri čemu hidrofobni ostaci aminokiselina izlaze na površinu proteina te smanjuju njegovu hidrofilnost (Vihinen, 2020).

#### 2.6.5. Stabilizirajuća i emulgirajuća svojstva proteina

Proteini posjeduju dobra emulgirajuća i stabilizirajuća svojstva zbog prisutnosti hidrofobnih i hidrofilnih aminokiselina te su oni površinski aktivne molekule. To je također povezano sa sposobnošću proteina da stvaraju međupovršinski film. Naime, kada su molekule proteina prisutne u emulzijama tipa ulje u vodi, one migriraju na granicu između ulja i vode te se preraspodjeljuju na način da hidrofobne skupine prodiru u uljnu fazu, a hidrofilne u vodenu fazu. U takvoj konfiguraciji proteini mogu formirati petlju koja usporava flokulaciju kapljica ulja, nakon čega slijedi stvaranje jakih viskoelastičnih filmova oko kapljice ulja. Takvi filmovi otporni su na mehaničke i ostale sile koje destabiliziraju emulzije. Prisutnost proteina na granici ulje-voda dovodi do smanjenja međufazne napetosti u emulzijama te se takav proteinski sloj suprotstavlja procesima destabilizacije ponašajući se kao strukturna, elektrostatička i mehanička energetska barijera stoga modifikacije strukture proteina (npr. denaturacija) mijenjaju svojstva emulgiranja. Naime, pokazalo se kako djelomična denaturacija dovodi do bolje sposobnosti emulgiranja zbog većeg izlaganja hidrofobnih aminokiselina površini. S druge strane, prekomjerna denaturacija smanjuje svojstva emulgiranja i pjenjenja. Također, povećanje površinskog naboja povećava stabilnost emulzije zbog povećanog odbijanja među slično nabijenim dijelovima. Emulgiranje je, dakle, izravno povezano sa površinskom hidrofobnošću i topljivošću proteina (Zayas, 1997).

#### 2.6.6. Kapacitet vezanja vode

Kapacitet vezanja vode predstavlja sposobnost proteina da spriječi otpuštanje vode iz svoje trodimenzionalne strukture. Kapacitet vezanja vode ima vrlo važnu ulogu pri razvoju teksture hrane, ponajviše u pečenom tijestu te usitnjenim mesnim proizvodima. Proteinski sastojci koji imaju vrlo visok kapacitet vezanja vode mogu dehidrirati neke druge sastojke u prehrambenom sustavu, dok su proteini sa niskim kapacitetom vezanja vode osjetljivi na vlagu u skladištu

prilikom njihova čuvanja. Nadalje, mnogi interni, eksterni te okolišni čimbenici (temperatura, pH, ionska jakost) utječu na kapacitet vezanja vode. Najmanji kapacitet vezanja vode za proteine je obično u izoelektričnoj točki gdje dominiraju protein-protein interakcije, a neto naboj proteina u otapalu je nula. Promjena u pH suspenzije u kojoj se protein nalazi dovodi do promjene naboja skupina proteina koje se potom ioniziraju te mijenjaju konformaciju proteina čime prikrivaju ili izlažu mjesta za vezanje vode (Haque, 2016).

#### 2.6.7. Kapacitet pjenjenja i stabilnost pjene

Kapacitet pjenjenja mjeri se količinom međufaznog područja stvorenog miksanjem hrane, a stabilnost pjene mjeri se vremenom potrebnim da se izgubi 50 % tekućine ili 50 % volumena pjene. Za stvaranje pjene uglavnom su odgovorni proteini. Kapacitet pjenjenja i stabilnost pjene ovise o međufaznom filmu koji održava suspenziju mjehurića zraka i usporava stopu koalescencije odnosno stapanja mjehurića, a tvore ga proteini. Pjene općenito nastaju stvaranjem džepova plina u tekućoj ili krutoj hrani pri čemu je u većini pjena volumen plina velik sa tankim tekućim ili čvrstim filmom koji odvaja područja plina. Postoji nekoliko uvjeta pri proizvodnji pjene: mora biti prisutan mehanički rad, moraju postojati površinski aktivne tvari koje smanjuju površinsku napetost te pjena mora nastajati brže nego što se razgrađuje. Stabilnost pjene odnosi se na sposobnost hrane da se stabilizira protiv mehaničkih i gravitacijskih naprezanja. Kapacitet pjenjenja i stabilnost pjene obrnuto su proporcionalni. Tako primjerice neko brašno koje ima visok kapacitet pjenjenja stvara velike mjehuriće zraka koji su okruženi manje fleksibilnim proteinskim filmom. Takvi mjehurići zraka lako se skupljaju te time smanjuju stabilnost pjene (Awuchi i sur., 2019).

Topljivi proteini koji mogu međusobno djelovati te stvarati guste viskozne filmove tvore najstabilnije pjene. Neke studije čak su ustanovile korelaciju između topljivosti proteina te njihovih svojstava pjenjenja, stabilnosti pjene te kapaciteta pjenjenja te su sugerirale da se kapacitet pjenjenja povećava sa povećanjem neto naboja protona. To je utvrđeno na studijama provedenim na proteinima bjelanjka jajeta, sojinim proteinima te koncentratu ribljeg proteina. McWatters i Cherry (1981) u svojem su radu ustanovili kako bi proteini u tekućem filmu trebali biti topljivi u vodenom mediju, koncentrirani na granici tekućina-zrak te u denaturiranom obliku zbog velike snage i viskoznosti. Proteinske čestice u disperzijama služe kao stabilizatori pjene jer predstavljaju fizičku prepreku spajanju mjehurića zbog svog položaja na granici zrak/voda (Cherry i McWatters, 1981).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1.MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorak

Za istraživanje je korišten izolat proteina iz boba (*Vicia faba* L.) koncentracije iznad 85 % proizveden i dobiven od strane tvrtke NutriS d.o.o., Novi Senkovac, Hrvatska. Ostatak uzorka čine škrob (<10 %), pepeo (<3,5 %) te vlakna (<5,0 %). Prilikom provođenja eksperimenta, uzorak izolata proteina iz boba čuvan je na sobnoj temperaturi u suhim uvjetima bez prisutnosti stranih mirisa.

##### 3.1.2. Kemikalije

- 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

- klorovodična kiselina, 37 %-tna (Carlo Erba Reagents S.A.S, Val de Reuil Cedex, Francuska)
- klorovodična kiselina, 1 M

*Priprema:* 20,77 mL 37 %-tne klorovodične kiseline (Carlo Erba Reagents S.A.S, Val de Reuil Cedex, Francuska) prenese se u odmjernu tikvicu od 250 mL te se nadopuni destiliranom vodom do oznake

- otopina reagens A

*Priprema:* 5 g natrijevog karbonata (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska) i 1 g natrijevog hidroksida (Lach-Ner, Neratovice, Češka) odvažuje se u papirnoj lađici za vaganje i kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 250 mL te se nadopuni destiliranom vodom do oznake

- otopina reagens B

*Priprema:* 0,05 g bakrovog (II) sulfata pentahidrata (Lach-Ner, Neratovice, Češka) i 0,1 g kalij, natrij-tartarata (Lach-Ner, Neratovice, Češka) odvažuje se u papirnoj lađici za vaganje i kvantitativno se prenese u bočicu od 10 mL te se nadopuni destiliranom vodom do oznake

- otopina reagens 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 razrijedi se destiliranom vodom u omjeru 1:2

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

### 3.1.3. Aparatura

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

### 3.1.4. Pribor

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

## 3.2.METODE

### 3.2.1. Ispitivanje topljivosti proteina i određivanje ukupnih proteina metodom po Lowryju

Prilikom određivanja koncentracije proteina, potrebna je izrada dijagrama ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina, odnosno baždarni dijagram. Prije početka rada potrebno je pripremiti otopine reagensa A, B i C te Folin-Ciocalteu reagens. Uz to, potrebno je pripremiti otopine proteina raspona koncentracija 0,02 – 0,1 mg/mL. Reagens A priprema se od 2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 0,1 M natrijevoj lužini. Za reagens B potrebno je pomiješati 5 %  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  u 1 % K, Na – tartaratu. Reagens C priprema se od 50 mL reagens A i 1 mL reagens B. Folin – Ciocalteu je komercijalni reagens kojeg je potrebno razrijediti destiliranom vodom u odnosu 1:2. 0,8 mL suspenzije proteina doda se u staklene epruvete te im se doda 4 mL reagens C. Suspenzija se miješa protresanjem te se ostavi stajati na sobnoj temperaturi 10-15 minuta. Nakon tog vremena, suspenziji se naglo dodaje Folin-Ciocalteu reagens te se snažno promiješa na vortex tresilici i ostavi stajati na sobnoj temperaturi 40-60 minuta. Suspenzijama se potom mjeri apsorbancija na UV/VIS spektrofotometru na 740 nm. Potrebno je napraviti mjerenja za 4 različite pH vrijednosti – 3, 5, 7 i 9.



**Slika 4.** Podešavanje pH vrijednosti na magnetskoj miješalici (*vlastita fotografija*)

### 3.2.2. Kapacitet i stabilnost pjenjenja

Na analitičkoj vagi izvagano je 20 g proteina i otopljeno u 200 mL destilirane vode. Izvagana su 4 uzorka te je svakom od 4 uzorka podešen pH na 3, 5, 7 odnosno 9. Suspenzija svakog pH podijeljena je na 2 dijela (2x100 mL). 100 mL suspenzije proteina određenog pH miješano je 15 minuta mikserom na najvećoj brzini. U intervalima od po 5 minuta uzima se 100 mL pjene koja se zatim izvaže. Nakon vaganja se pjena vraća u posudu za miksiranje te se nastavlja miksirati narednih 5 minuta dok se ne izvrše tri uzastopna mjerenja. Nakon što se izvrše mjerenja, postotak povećanja volumena računa se jednadžbom:

$$\% \text{ povećanja} = \frac{m(100 \text{ mL suspenzije proteina}) - m(100 \text{ mL pjene})}{m(100 \text{ mL pjene})} \times 100 \quad [1]$$

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

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

Pri čemu je:

$m_t$  – masa ocijedene tekućine iz pjene

$m_{li}$  – masa lijevka

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

$m_m$  – masa menzure

Nakon što se izlije pjena u stakleni lijevak, zabilježi se vrijeme kada je pala prva kap tekućine te je time određen *indeks stabilnosti pjene*, a vrijeme potrebno da se ocijedi sva pjena daje podatak o *minimalnoj stabilnosti pjene* (slika 5.). Za ispitivanje svojstava pjenjenja svi uzorci mjereni su u dvije paralele.



**Slika 5.** Određivanje stabilnosti pjene metodom prve i zadnje kapi (*vlastita fotografija*)

### 3.2.3. Određivanje svojstava emulgiranja proteina

Na analitičkoj vagi u laboratorijsku čašu od 250 mL izvaže se 6 g izolata proteina boba te se nadopuni deioniziranom vodom do oznake. Potrebno je napraviti 4 suspenzije, po jednu za svaku pH vrijednost. Dobivenoj 3 %-tnoj suspenziji proteina namješta se pH vrijednost dodatkom 1 M natrijeve lužine odnosno 1 M klorovodične kiseline do pH vrijednosti od 3, 5, 7 i 9. Suspenzija se cijelo vrijeme miješa na magnetnoj miješalici.

Dobivena suspenzija podijeli se u dvije paralele od po 100 mL te se u svaku doda po 50 mL suncokretovog ulja (Zvijezda plus d.o.o., omjer 2:1). Suspenzije se miješaju mikserom na najvećoj brzini 90 sekundi te se dobivenoj emulziji mjeri apsorbancija pri 500 nm u kiveti debljine 1 cm u dvije paralele pri čemu se kao slijepa proba upotrebljava 100 mL deionizirane vode pomiješane sa 50 mL suncokretovog ulja. Kako bi se odredila stabilnost emulzije, nakon prvog se mjerenja emulzije ostave stajati na sobnoj temperaturi 10 minuta nakon čega im se ponovo mjeri apsorbancija pri 500 nm. Mutnoća emulzije izračunava se po sljedećoj formuli:

$$T = 2,303 \times \frac{A}{l} \quad [3]$$

pri čemu je:

$T$  = mutnoća,

$A$  = apsorbancija pri 500 nm

$I$  = debljina kivete.

Indeks aktiviteta emulzije izračunava se po sljedećoj jednadžbi:

$$IAE = \frac{2 \times T \times A \times r}{V_U \times C \times 1000} \quad [4]$$

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

$r$  = faktor razrjeđenja.

Indeks stabilnosti emulzije računa se po sljedećoj jednadžbi:

$$ISE = \frac{T \times \Delta t}{\Delta T} \quad [5]$$

pri čemu je:

$T$  = mutnoća određena na početku,

$\Delta t$  = vremenski interval (10 min = 0.167 h)

$\Delta T$  = promjena mutnoće u vremenskom intervalu od 10 minuta.

#### 3.2.4. Određivanje kapaciteta vezanja vode

U čašu od 50 mL izvaže se 1,667 g proteina boba te se doda 50 mL deionizirane vode. Pripravljenim suspenzijama podesi se željeni pH te se suspenzije prebace u kivete od 50 mL. Nakon 30 minuta kivete se centrifugiraju na 8000 okretaja/min 20 minuta. Nakon centrifugiranja, odvoji se supernatant te se kivete sa ostatkom važu. Kapacitet vezanja vode računa se po izrazu (WHC – *water holding capacity* – kapacitet vezanja vode):

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

pri čemu je:

$M_0$  = masa uzorka,

$M_1$  = kiveta sa suhim uzorkom

$M_2$  = kiveta sa uzorkom nakon centrifuge.

### 3.2.5. Statistička analiza

Svi dobiveni rezultati obrađeni su u programu Microsoft Excel.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Cilj ovog rada bio je analizirati neka od funkcionalnih svojstava izolata proteina iz boba. Na temelju tih rezultata, cilj je utvrditi je li moguće spomenute izolate proteina koristiti u proizvodnji novih prehrambenih proizvoda, kao dodatak prehrani ili u svrhu obogaćivanja već postojećih prehrambenih proizvoda.

U tablici 2. prikazane su vrijednosti apsorbancija suspenzija izolata proteina boba pri različitim pH vrijednostima. Na slici 6. moguće je vidjeti grafički prikaz koncentracije otopljenih proteina boba dobivenih na temelju apsorbancije pri 740 nm kod različitih pH vrijednosti. Slika 7. prikazuje promjenu boje suspenzije proteina ovisno o pripadajućoj koncentraciji proteina. Na slici 8 prikazan je postotak povećanja volumena pjene ovisno o pH vrijednosti te o vremenu miješanja smjese. Slike 9., 10., 11. i 12. prikazuju različite izgled pjene smjesa izolata proteina boba ovisno o različitim pH vrijednostima te o vremenima miksiranja smjese. Tablica 3 prikazuje izračun stabilnosti pjene suspenzije izolata proteina boba. Na slici 13. prikazana je ovisnost indeksa stabilnosti pjene o različitim pH vrijednostima.. U tablici 4. prikazana je vrijednost apsorbancije emulzija proteina i ulja pri različitim pH vrijednostima na 500 nm odmah po završetku miksiranja emulzije te nakon 10 minuta stajanja na sobnoj temperaturi. Tablica 5 prikazuje izračun mutnoće emulzija pri različitim pH vrijednostima odmah po završetku miksiranja emulzije te nakon 10 minuta. Slika 14. predstavlja grafički prikaz ovisnosti indeksa aktiviteta emulzije o pH vrijednosti, a na slici 15. prikazana je ovisnost indeksa stabilnosti emulzije o pH vrijednosti. Na slici 16. prikazana je sposobnost proteina da vežu vodu pri različitim pH vrijednostima.

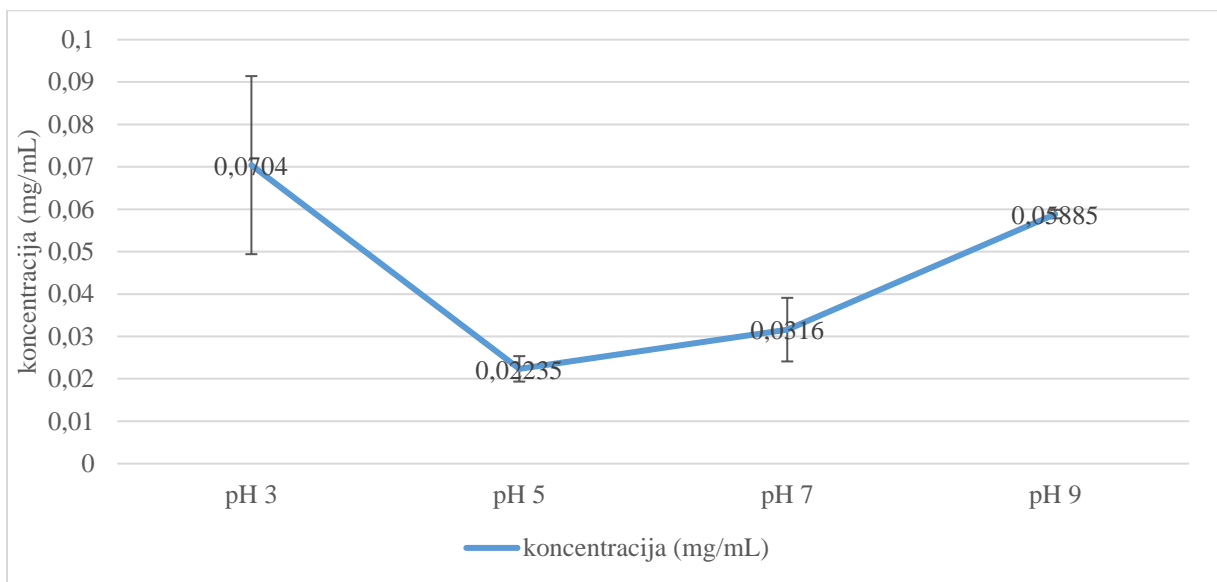
### **4.1. ISPITIVANJE TOPLJIVOSTI PROTEINA**

Topljivost proteina određena je u suspenzijama izoliranih proteina koncentracije (0,5 %-tna suspenzija). U tablici 2 navedene su vrijednosti apsorbancija izmjerene na UV/VIS spektrofotometru. Iz izmjerenih apsorbancija izračunate su koncentracije proteina pomoću baždarnog dijagrama sa poznatim vrijednostima koncentracija. Izračunate koncentracije prikazane su na slici 6.



**Tablica 2.** Vrijednosti apsorbancija suspenzija boba različitih pH vrijednosti

| pH vrijednost | Apsorbancija (740 nm) |
|---------------|-----------------------|
| 3             | 0,313±0,021           |
| 5             | 0,175±0,003           |
| 7             | 0,2145±0,0075         |
| 9             | 0,280±0,001           |



**Slika 6.** Prikaz korelacije koncentracije proteina sa apsorbancijom pri različitim pH vrijednostima

Topljivost neke tvari (u ovom slučaju proteina) se odnosi na sposobnost te prehrambene tvari da se otopi u nekom otapalu (najčešće u vodi ili ulju), a predstavlja se kao najveća količina neke tvari otopljene u zadanom otapalu u ravnoteži (Awuchi i sur., 2019).

Topljivost proteina u vodenom mediju ovisi od odnosa protein-voda te protein-protein interakcija, odnosno koliko su protein-voda interakcije dominantnije nad protein-protein interakcijama, a izražava se kao postotak proteina u vodenoj otopini koji, prilikom primjena umjerenih centrifugalnih sila, nije sedimentiran. Topljivost je jedno od najvažnijih funkcionalnih svojstava proteina budući da ima utjecaja na boju proizvoda, emulgiranje,

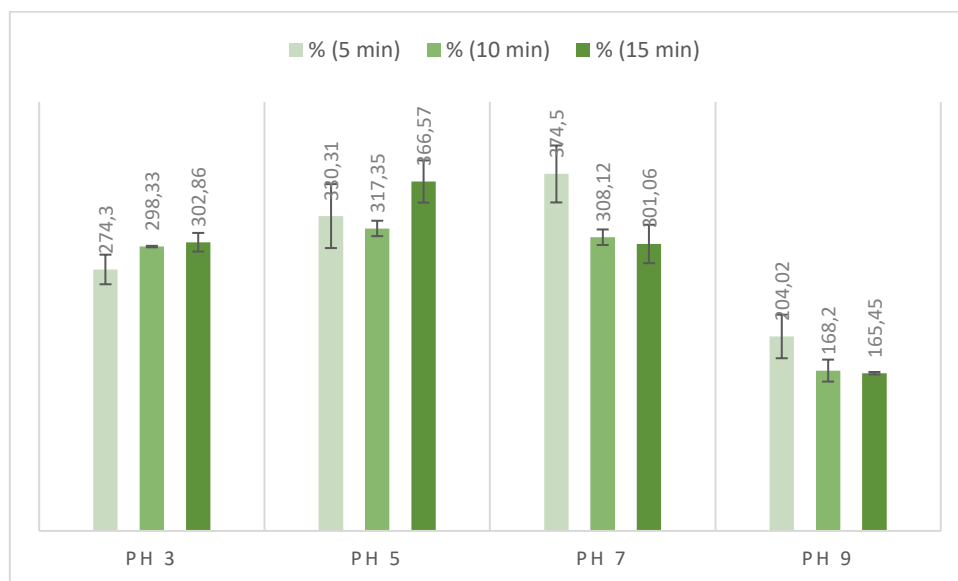
penjenje kao i senzorna svojstva proizvoda, a osim toga utječe i na sposobnost proteina da zadrže vodu te na mnoga fizikalno-kemijska svojstva proizvoda. Topljivost predstavlja glavni parametar po kojem se određuje prikladnost određenog proteina u hrani i piću. Sama topljivost ovisi o sastavu aminokiselina, molekularnoj masi proteina, površinskim karakteristikama proteina, ali i o vanjskim čimbenicima kao što su temperatura, ionska jakost te pH vrijednost (Haque i sur., 2016).

Količina proteina određena je metodom po Lowryju. Baždarni pravac izrađen je pomoću standardne otopine proteina. Rezultati dobiveni pomoću baždarnog pravca prikazani su u Tablici 2. Iz rezultata je vidljivo kako je najveća koncentracija otopljenih proteina pri pH 3, a najmanja pri pH 5. Izoelektrična točka proteina predstavlja pH vrijednost pri kojoj neka molekula nema električni naboj, odnosno vrijednost električnog naboja iznosi 0. Izoelektrična točka uvelike utječe na topljivost proteina što znači da, ako se nađu u vodi ili otopini soli čija pH vrijednost odgovara izoelektričnoj točki tih proteina, njihova topljivost je minimalna te se oni često talože iz otopine (Haque i sur., 2016). Izoelektrična točka izolata proteina boba ima vrijednost blizu pH 5 što objašnjava dobivene rezultate i vrlo malu koncentraciju otopljenih proteina u otopine pri pH 5. Najveće koncentracije otopljenih proteina nalaze se u otopinama sa pH 3 te pH 9. Oba pH dovoljno su daleko od izoelektrične točke izolata proteina boba te molekule imaju dovoljan električni naboj da mogu stupati u interakcije sa molekulama vode.

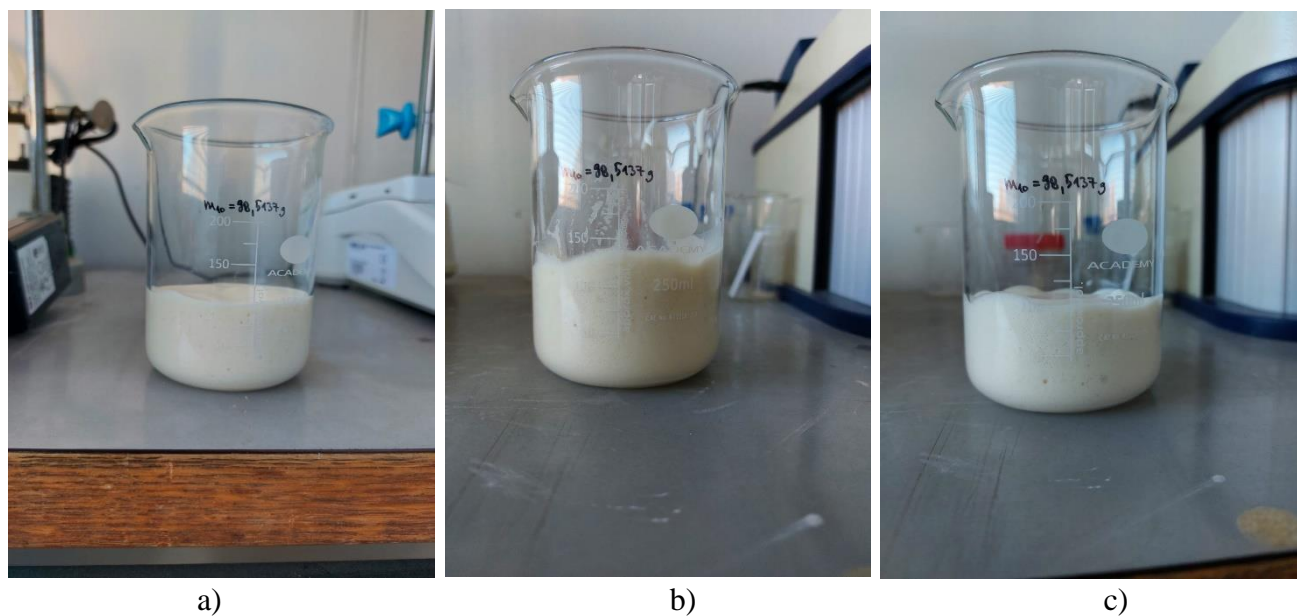


**Slika 7.** Epruvete sa uzorcima proteina različitih koncentracija i pH vrijednosti

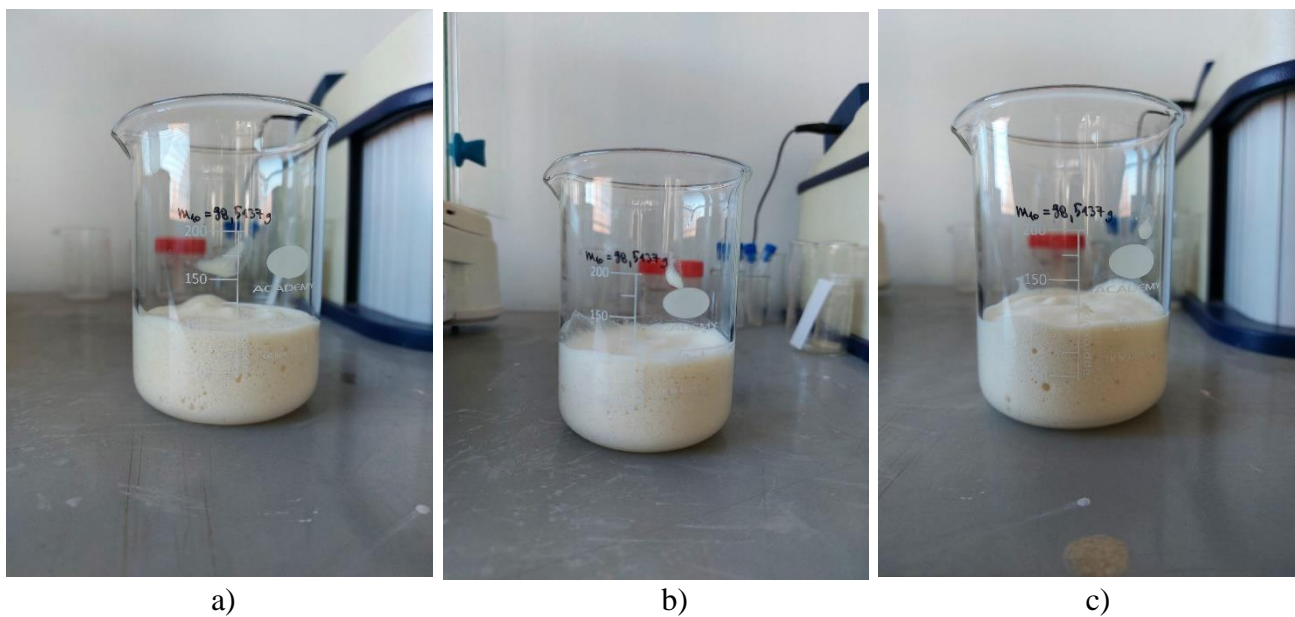
## 4.2. KAPACITET I STABILNOST PJENJENJA



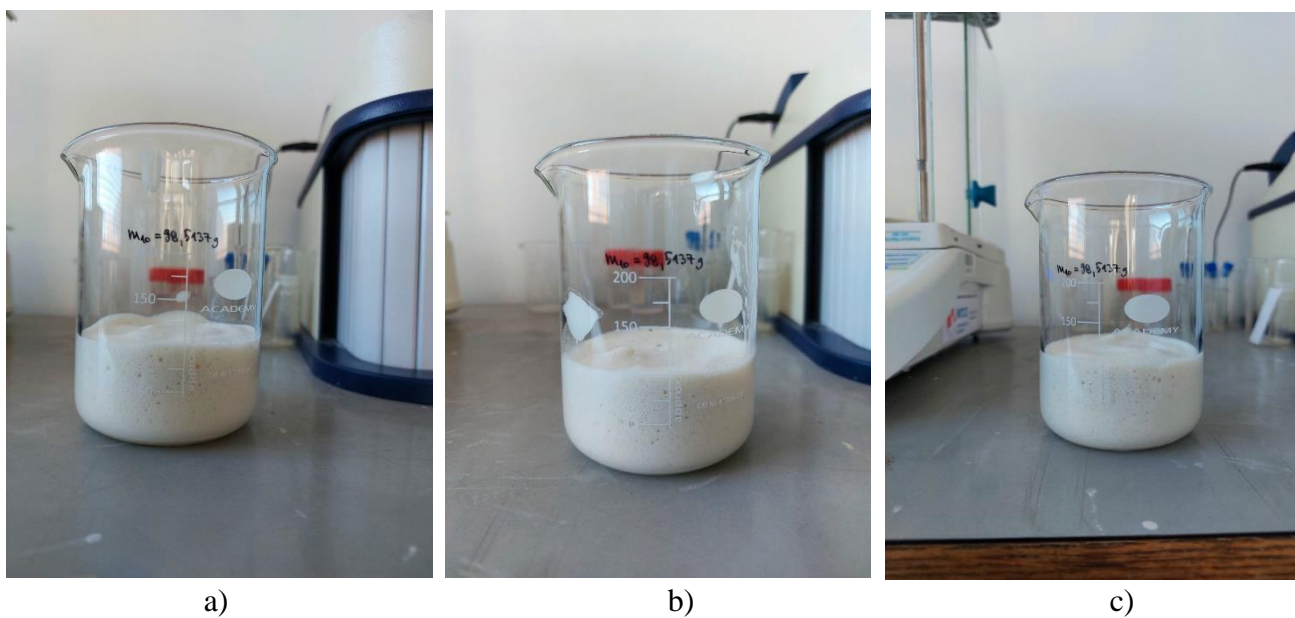
**Slika 8.** Prikaz postotka povećanja volumena pjene pri različitim pH vrijednostima te pri različitim vremenima miješanja



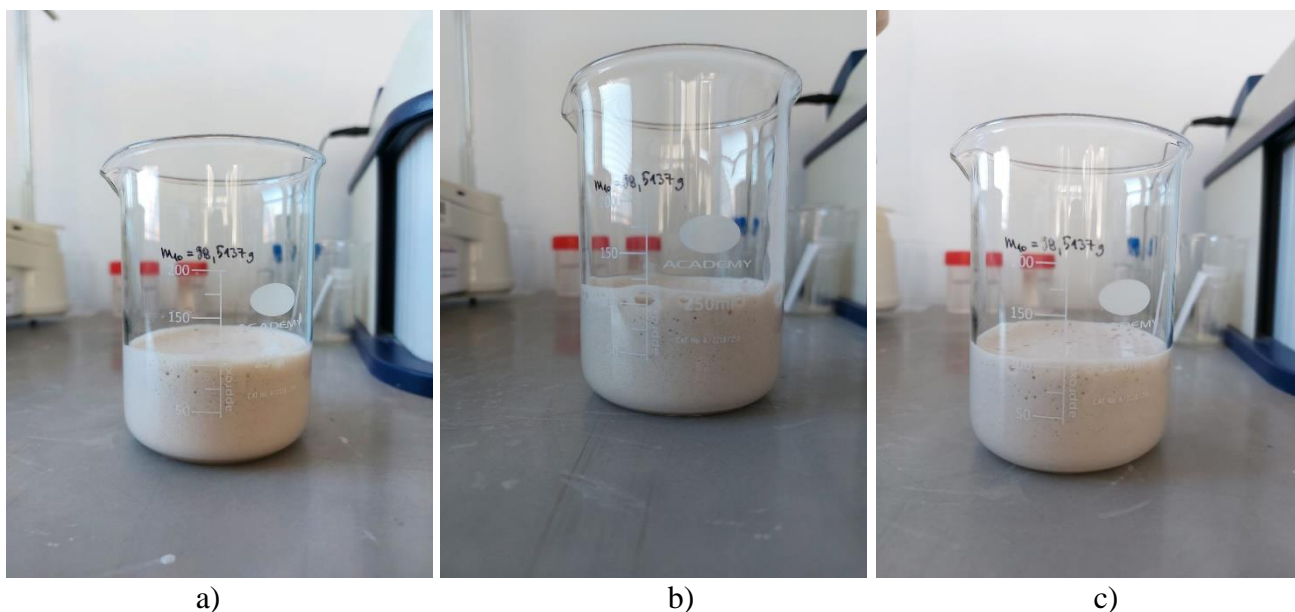
**Slika 9.** Pjena suspenzije izolata proteina boba pri pH 3 nakon (a) 5 minuta miješanja, (b) 10 minuta miješanja te (c) 15 minuta miješanja (*vlastite fotografije*)



**Slika 10.** Pjena suspenzije izolata proteina boba pri pH 5 nakon (a) 5 minuta miješanja, (b) 10 minuta miješanja te (c) 15 minuta miješanja (*vlastite fotografije*)



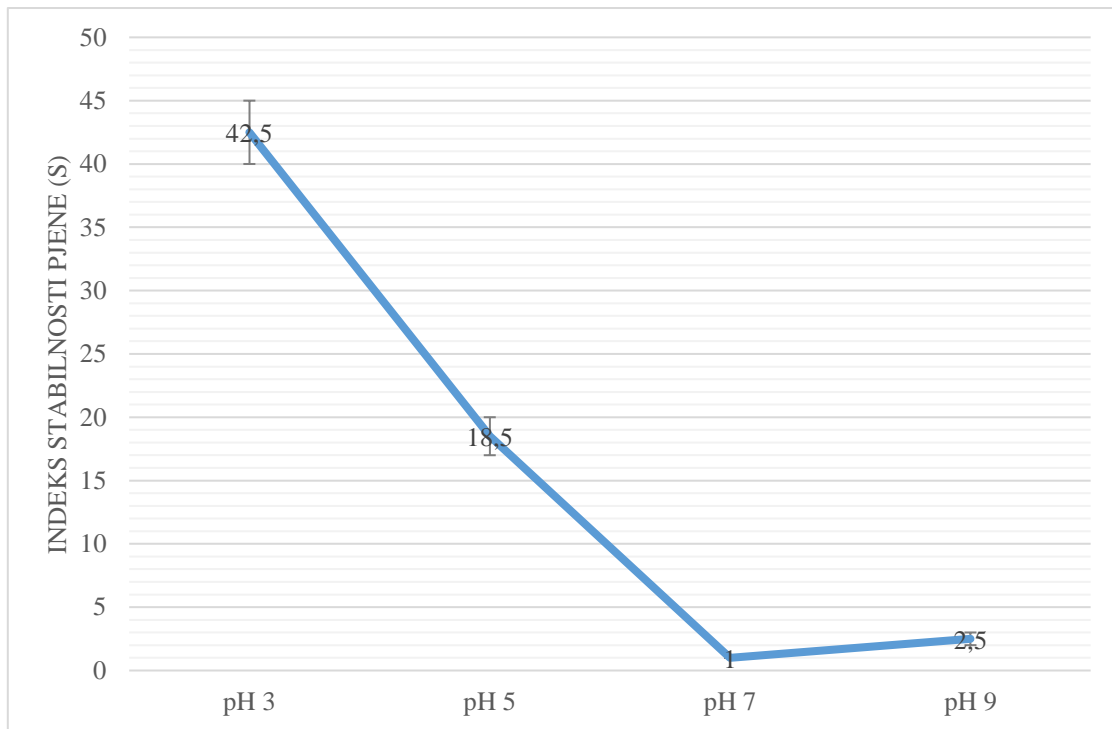
**Slika 11.** Pjena suspenzije izolata proteina boba pri pH 7 nakon (a) 5 minuta miješanja, (b) 10 minuta miješanja te (c) 15 minuta miješanja (*vlastite fotografije*)



**Slika 12.** Pjena suspenzije izolata proteina boba pri pH 3 nakon (a) 5 minuta miješanja, (b) 10 minuta miješanja te (c) 15 minuta miješanja (*vlastite fotografije*)

**Tablica 3.** Stabilnost pjene

|                             | <b>pH 3</b>      | <b>pH 5</b>       | <b>pH 7</b>       | <b>pH 9</b>       |
|-----------------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Masa tekućine (g)</b>    | 16,8218 ± 1,4266 | 17,9887 ± 0,09575 | 22,2065 ± 0,05025 | 32,5427 ± 0,68705 |
| <b>Minimalna stabilnost</b> | 50'              | 10'               | 11'               | 3'15"             |



**Slika 13.** Prikaz ovisnosti indeksa stabilnosti o pH vrijednosti

Sposobnost formiranja pjene ovisna je o sposobnosti polipeptidnih lanaca da se rastvore te da se usmjere prema međupovršini tekućina-zrak. Zbog smanjenja površinske napetosti, potrebna je brza difuzija proteina na tu međupovršinu kako bi se mogla formirati stabilna pjena. Pri tome se događa djelomično otvaranje molekule proteina te inkorporiranje mjehurića zraka čime dolazi do stvaranja intramolekulskog kohezivnog filma određenog stupnja elastičnosti (Amagliani i sur., 2017).

U svojem istraživanju Zayas (1997.) je proučavao svojstva pjenjenja biljnog proteina soje te dokazao kako su svojstva pjenjenja proteina poboljšana redukcijom disulfidnih veza u proteinu čime se povećala njegova hidrofobnost i viskoznost filma. Time je došlo do promjena na površini proteina te do jačih protein-protein interakcija čime su proizvedeni jači filmovi. Naime, redukcijom disulfidnih mostova došlo je do povećanja površinske hidrofobnosti što je za posljedicu imalo povećanje površinske aktivnosti proteina. Dakle, djelomičnom denaturacijom tercijarne strukture proteina dolazi do većeg izlaganja prije nedostupnih, nepolarnih aminokiselinskih skupina te do poboljšanja svojstava pjenjenja. Osim toga, redukcijom disulfidnih veza dolazi do poboljšanja reoloških svojstava međupovršinskog filma kao npr. elastičnost filma ili površinske granice tečenja. Na sama svojstva proteina koja im omogućuju stvaranje stabilnih filmova u pjenama utječu molekularna konfiguracija proteina,

intermolekularne veze tih proteina te sadržaj i raspored hidrofobnih aminokiselinskih ostataka na proteinu. Pri konformacijskim promjenama proteina na granici zrak/voda dolazi do izlaganja hidrofobnih dijelova molekule što ubrzava povezivanje polipeptidnih lanaca na samoj granici. Rezultat toga je stvaranje kontinuiranog kohezivnog filma oko mjehurića zraka. Topljivost pojedinih proteina te odgovarajući omjer između hidrofilnih i hidrofobnih skupina u najvećoj mjeri određuju svojstva pjenjenja pojedinog proteina (Zayas, 1997).

pH suspenzije je jedan od glavnih faktora koji utječe na sposobnost pjenjenja proteina. Elektrostatsko privlačenje između proteina ima maksimalnu vrijednost kod izoelektrične točke (pI) te dolazi do većeg adsorbiranja proteina na površinu smanjujući time međufaznu napetost. Zbog tog jakog elektrostatskog povezivanja molekula proteina, međufazni su filmovi najdeblji te sa najvećom elastičnošću te viskoznošću. Kod pI proteina izmjerene su maksimalne vrijednosti stabilnosti pjene te viskoznosti zbog najveće količine elektrostatskog privlačenja između molekula proteina, a time je poboljšana i stabilnost pjene. Također, kod pI najmanje je međusobno odbijanje molekula što omogućava lako adsorbiranje proteina na granici, a površinska elastičnost, koja je inače kritičan parametar stabilnosti pjene, kod pI je postigla svoj maksimum. Dakle, visoka stabilnost pjene kod izoelektrične točke proteina objašnjiva je činjenicom da su na granici zrak/voda povećane debljina i krutost proteinskih filmova zbog jakog elektrostatskog privlačenja molekula proteina u izoelektričnoj točki. Električna svojstva proteina, odnosno njihov površinski naboj, u velikoj mjeri utječu na stabilnost nastale pjene. Kod velike količine električnog naboja molekula dolazi do nepotpune pokrivenosti filma proteinskim molekulama što je posljedica odbijanja prisutnih naboja pri stvaranju filma. Kod topljivih proteina, maksimalni kapacitet pjenjenja zabilježen je kod pI točke proteina budući da je kod pI broj naboja na površini proteina minimalan, a površinska viskoznost je maksimalna (Zayas, 1997.) Dakle, rezultati dobiveni ovim istraživanjem u skladu su sa rezultatima iz prijašnjih radova.

Povećanje volumena izraženo u postocima služi za prikazivanje količine inkorporiranog zraka, a bilježi se svakih 5 minuta tijekom 15 minuta miješanjem 10 %-tne suspenzije proteina. Rezultati su vidljivi u na slici 8. kao i na slikama 9., 10., 11. i 12. Iz slike 8. vidljivo je da je najveći postotak povećanja pjene pri pH 7 (5 min: 374,50 %, 10 min: 308,12 %, 15 min: 301,06 %) nakon čega slijedi pH 5 (5 min: 330,31 %, 10 min: 317,35 %, 15 min: 366,57 %) dok su na začelju pH 3 (5 min: 274,30 %, 10 min: 298,33 %, 15 min: 302,86 %) i pH 9 (5 min: 204,02 %, 10 min: 168,20 %, 15 min: 165,45 %).

Stabilnost pjene zahtijeva formiranje viskoznog, kohezivnog, elastičnog, zrakonepropusnog te kontinuiranog filma oko svakog mjehurića plina. Na stabilnost pjene utječe sposobnost prelaska proteina iz filma iz područja niske međufazne napetosti u područje visoke međufazne napetosti, takozvani Marangoni efekt. Sama stabilnost pjene određena je fizikalnim svojstvima formiranog filma, a na nju utječu mehanička čvrstoća i debljina formiranog filma, protein-protein interakcije te okolišni čimbenici kao što su temperatura i pH. Deblji filmovi imaju veću stabilnost pjene zbog svoje veće mehaničke čvrstoće te boljih teksturnih svojstava. Sposobnost proteina da formira multimolekularnu matricu određuje otpornost proteinske pjene na kolaps mjehurića i koalescenciju. Jedan od glavnih čimbenika koji utječe na stabilnost pjene jest viskoznost površinskog sloja i tekućine, odnosno filmovi koji imaju visoku površinsku viskoznost imaju tendenciju stvaranja snažne pjene zbog jakih kohezijskih sila između proteinskih molekula. Na stabilnost pjene veliki utjecaj imaju svojstva i koncentracija korištenog proteina, njegova topljivost te ionska snaga. Stabilnost pjene svoj maksimum postiže u izoelektričnoj točki proteina gdje je i površinska elastičnost na svome maksimumu. Na stabilnost pjene utječu i reološka svojstva samog proteinskog filma. Površinska granica tečenja predstavlja karakteristiku viskoelastičnosti filma koja ovisi o protein-protein interakcijama (Zayas, 1997). Maksimalna površinska granica tečenja javlja se između pH 5 i 6 te se naglo smanjuje pri pH većem od 6. Najveća zabilježena stabilnost trebala bi biti u izoelektričnom području zbog smanjenja površinske napetosti i povećanja elastičnosti filma što potvrđuje rezultate dobivene provedenim analizama gdje je indeks stabilnosti pri pH 3 42,5", a pri pH 5 18,5".



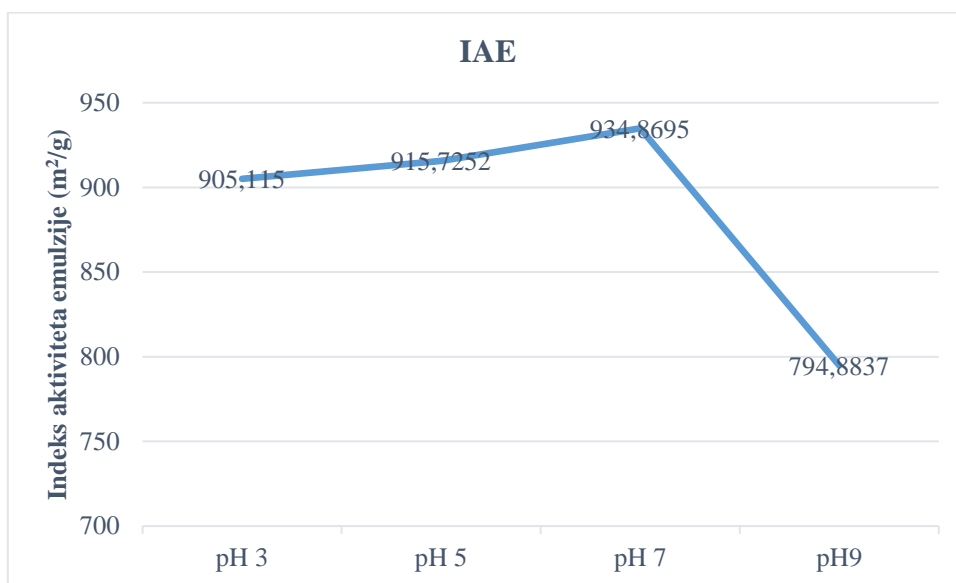
### 4.3. ODREĐIVANJE SVOJSTAVA EMULGIRANJA PROTEINA

Tablica 4. Vrijednost apsorbancije emulzija na 500 nm

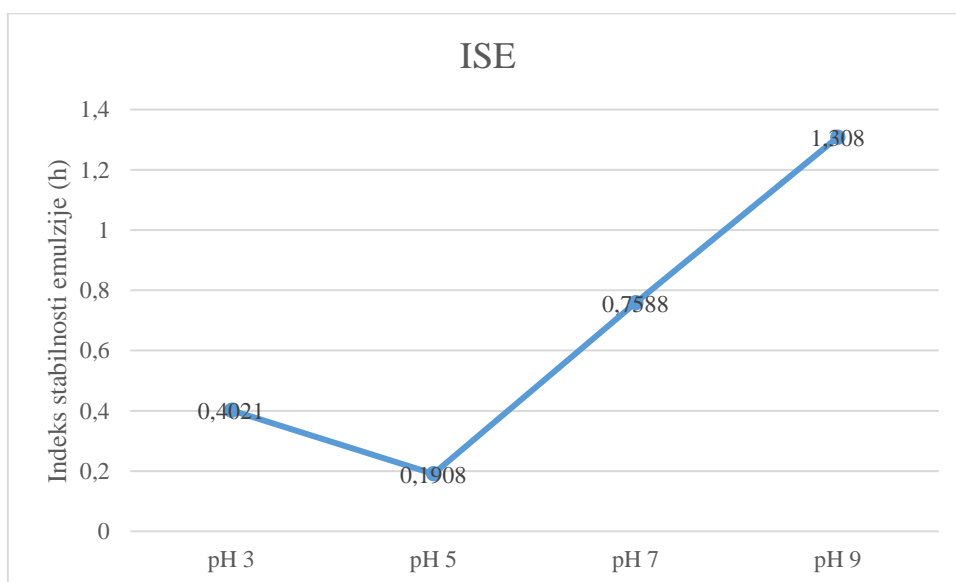
|  | <b>pH 3</b>         | <b>pH 5</b>         | <b>pH 7</b>     | <b>pH 9</b>         |
|--|---------------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| <b>Apsorbancija,<br/>500 nm</b>                    | 4,4107 ± 0,0156     | 4,4430 ±<br>0,11725 | 4,4826 ± 0,063  | 4,1334 ± 0,0706     |
| <b>Apsorbancija,<br/>500 nm –<br/>nakon 10 min</b> | 2,5788 ±<br>0,02255 | 0,6525 ± 0,6272     | 3,4961 ± 0,0155 | 3,5787 ±<br>0,02315 |

Tablica 5. Izračunata mutnoća emulzija izolata proteina boba

|                                     | <b>pH 3</b>           | <b>pH 5</b>            | <b>pH 7</b>            | <b>pH 9</b>           |
|-------------------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| <b>Mutnoća</b>                      | 1015,7842 ±<br>3,5927 | 1023,2114 ±<br>27,0027 | 1032,3482 ±<br>14,5089 | 951,9220 ±<br>16,2592 |
| <b>Mutnoća<br/>nakon 10<br/>min</b> | 593,8862 ±<br>5,19325 | 150,2708 ± 144,444     | 805,1519 ± 3,56965     | 830,3812 ± 5,3314     |



**Slika 14.** Prikaz ovisnosti indeksa aktivteta emulzije o pH vrijednosti suspenzije



**Slika 15.** Ovisnost indeksa stabilnosti emulzije o pH vrijednosti

Postupak određivanja svojstava emulgiranja proteina zasniva se na mjerenju apsorpcije emulzije na UV/VIS spektrofotometru na temelju koje se izračuna vrijednost mutnoće. Sposobnost proteina da se tijekom stvaranja emulzije velikom brzinom apsorbira na granici ulje/voda sprječavajući time flokulaciju i ponovo povezivanje čestica ulja izraženo je indeksom aktiviteta emulzije (IAE). Sposobnost proteina da u određenom vremenskom razdoblju održava stabilnu emulziju prikazana je indeksom stabilnosti emulzije (ISE) (Lam i Nickerson, 2014).

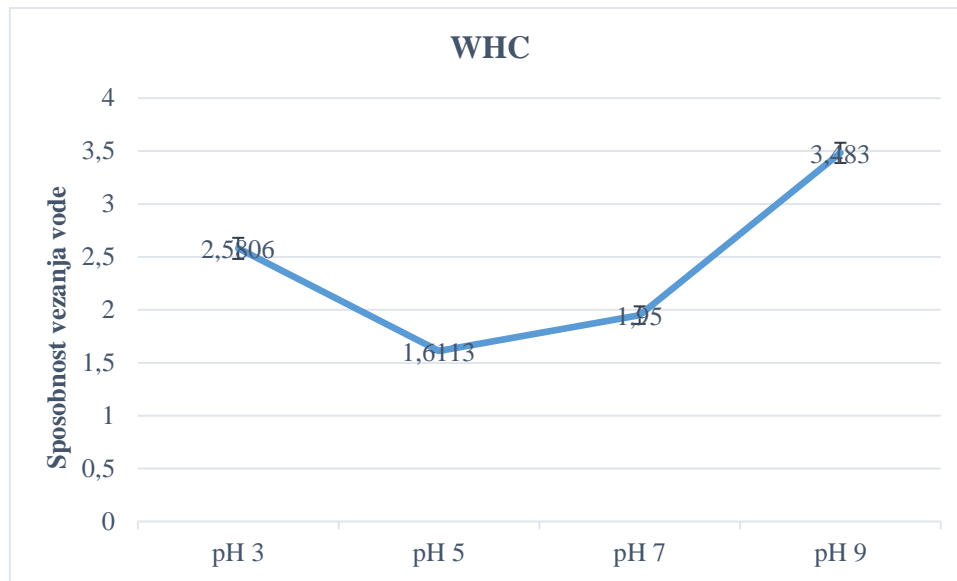
Na slici 14. vidljivo je da je najveća moć adsorbiranja proteina boba na granici voda/ulje pri pH 7 gdje indeks aktiviteta emulzije iznosi 934,8695 m<sup>2</sup>/g nakon čega slijede pH 5 (915,7252 m<sup>2</sup>/g), pH 3 (905,1150 m<sup>2</sup>/g), a najslabiju sposobnost adsorbiranja na granici ulje/voda proteini boba pokazuju pri pH 9 (794,8837 m<sup>2</sup>/g). Iako su indeksi aktiviteta emulzije zadovoljavajući, indeksi stabilnosti emulzije relativno su niski što je bilo i očekivano budući da su se nakon tek nekoliko minuta stajanja, slojevi ulja i suspenzije proteina počeli razdvajati te su se proteini počeli taložiti. Da izolati proteina boba imaju nisku sposobnost održavanja stabilnosti emulzije, odnosno nizak indeks stabilnosti emulzije vidljivo je i iz tablice 5. u kojoj su prikazane mutnoće pripremljenih emulzija izračunate na temelju očitanih apsorpcija na 500 nm. Već nakon 10 minuta stajanja na sobnoj temperaturi, emulzije su se počele razdvajati te je na UV/VIS spektrofotometru očitana manja apsorpcija te posljedično izračunata manja mutnoća. Najmanja razlika u vrijednostima apsorpcija i mutnoća očitana je na pH 9 ( $A_{0 \text{ min}}$ : 4,1334 ± 0,0706,  $A_{10 \text{ min}}$ : 3,5787 ± 0,02315;  $M_{0 \text{ min}}$ : 951,9220 ± 16,2592,  $M_{10 \text{ min}}$ : 830,3812 ± 5,3314), nakon čega slijede pH 7 ( $A_{0 \text{ min}}$ : 4,4826 ± 0,062,  $A_{10 \text{ min}}$ : 3,4961 ± 0,0155;  $M_{0 \text{ min}}$ : 1032,3482 ± 14,5089,  $M_{10 \text{ min}}$ : 805,1519 ± 3,56965) te pH 3 ( $A_{0 \text{ min}}$ : 4,4107 ± 0,0156,  $A_{10 \text{ min}}$ : 2,5788 ± 0,02255;  $M_{0 \text{ min}}$ : 1015,7842 ± 3,5927,  $M_{10 \text{ min}}$ : 593,8862 ± 5,19325), dok je najveća razlika zamijećena pri pH 5 ( $A_{0 \text{ min}}$ : 4,4430 ± 0,11725,  $A_{10 \text{ min}}$ : 0,6525 ± 0,6272;  $M_{0 \text{ min}}$ : 1023,2114 ± 27,0027,  $M_{10 \text{ min}}$ : 150,2708 ± 144,444).

U formiranje emulzije, njenu stabilnost te svojstva teksture uključeni su mnogi kemijski i fizikalni međusobno povezani čimbenici. Kapacitet i sama stabilnost emulzija ovise o svojstvima proteina te uvjetima emulgiranja, a variraju ovisno o pH, ionskoj jakosti i drugim čimbenicima. Nakai i suradnici su u svojem istraživanju ustvrdili da na emulgiranje globularnih proteina utječu topljivost, površinska hidrofobnost te molekularna fleksibilnost, a sposobnost emulgiranja proteina ovisna je o obliku, hidrofobnosti te naboju proteinskih molekula. Kato i Nakai su u svojem istraživanju dokazali snažnu korelaciju između hidrofobnosti površine proteina i kapaciteta emulgiranja, a Kato i suradnici dokazali su korelaciju hidrofobnosti površine proteina te međupovršinske napetosti proteinskih otopina sa emulgirajućim

svojstvima proteina. Proteini sa visokom površinskom hidrofobnošću adsorbiraju se na granici ulje/voda te smanjuju površinsku ili međufaznu napetost čime olakšavaju stvaranje emulzija. Još jedan važan čimbenik koji utječe na svojstva emulgiranja je topljivost proteina. Povećanjem topljivosti proteina povećala se i sposobnost proteina da formiraju i stabiliziraju emulziju. Također je utvrđena i korelacija između topljivosti proteina, sposobnosti stvaranja emulzije te utjecaja pH na stvaranje emulzije pri čemu je minimalna sposobnost uočena u izoelektričnom području. pH utječe na topljivost proteina, njihovu konformaciju te površinska svojstva utječući time neizravno na sposobnost stvaranja emulzija. pH utječe i na stabilnost emulzija utječući na naboj proteina. U razrijeđenim emulzijama kod izoelektričnog pH dolazi do smanjenja odbijanja između kapljica masti što uzrokuje stvaranje flokula i destabilizaciju emulzije. Pri pH vrijednostima koje su dalje od izoelektrične točke dolazi do povećanja odbijanja i zeta potencijala te je flokulacija minimalna (Zayas, 1997). Stabilnost emulzije predstavlja sposobnost kapljica emulzije da ostanu raspršene bez flokulacije ili spajanja. Emulzije koje imaju nisku stabilnost vizualnim će pregledom izgledati kao odvajanje masnoće što se desilo sa emulzijama analiziranim u ovom radu.

#### **4.4. ODREĐIVANJE KAPACITETA VEZANJA VODE**

WHC ili kapacitet zadržavanja vode predstavlja sposobnost zadržavanja vlastite kao i dodane vode prilikom primjene prešanja, centrifugiranja ili zagrijavanja. Ono se definira kao fizikalno svojstvo te sposobnost sprječavanja otpuštanja vode iz trodimenzionalne strukture proteina. Naime, neka od najvažnijih funkcionalnih svojstava proteina povezana su s njihovom interakcijom s vodom, a te interakcije protein-voda potom određuju funkcionalna svojstva proteina u hrani kao npr. topljivost, svojstva emulgiranja, vezanje i zadržavanje vode i druga svojstva. Sposobnost zadržavanja vode je preliminarni korak u mnogim procesima proizvodnje hrane budući da ima veliku ulogu u formiranju teksture hrane, posebice kod pečenih tijesta te usitjenih mesnih proizvoda (Zayas, 1997).



**Slika 16.** Sposobnost vezanja vode izolata proteina boba pri različitim pH vrijednostima

Način na koji će protein djelovati u hrani, odnosno hoće li se ponašati kao gel, koloidna disperzija ili netopljivi talog, ovisi o karakteru protein-protein te protein-voda interakcija. Samo vezanje vode na proteinsku molekulu ovisi o sastavu te konformaciji proteinske molekule. Voda i proteini stupaju u interakciju na više različitih načina, a najveće količine vode vezane su vodikovim vezama za hidrofilne skupine bočnih lanaca proteina. Slobodna voda koja se nalazi u većim porama proteina važna je za senzoričku proizvodnju, točnije na sočnost proizvoda te oslobađanje okusa. Takva se voda gubi tijekom prerade. Kapacitet vezanja vode u proizvodu biti će bolji što su manje pore te što su ravnomjernije raspoređene u strukturi proizvoda (Zayas, 1997).

Na sposobnost proteina da vežu vodu utječu pH vrijednost, koncentracija proteina, temperatura, ionska jakost, uvjeti skladištenja, ali i prisutnost nekih drugih komponenti hrane te duljina i brzina toplinske obrade. Najmanja sposobnost vezanja vode je u izoelektričnom području proteina gdje su protein-protein interakcije na najvišoj razini, a neto naboj proteina je nula. Promjenom pH suspenzije dolazi do promjena u naboju proteinske molekule te do izlaganja ili sakrivanja mjesta za vezanje vode na proteinu. Dakle, povećanjem polarosti proteina dolazi raste količina vezane vode. Mjerenje sposobnosti zadržavanja vode neophodno je kako bi se mogle proučavati protein-voda interakcije te funkcionalnost tih proteina.

Na slici 16. vidljivo je da je najveća sposobnost vezanja vode pri pH 9 ( $3,4830 \pm 0,0959$  g/g), nakon čega slijedi pH 3 ( $2,5806 \pm 0,0999$  g/g) dok je sposobnost vezanja vode pri pH 5

( $1,6113 \pm 0,01115$  g/g) te pH 7 ( $1,9500 \pm 0,083$  g/g) nešto niža zbog manje količine neto naboja molekule proteina te zbog jakih protein-protein interakcija pri tim pH vrijednostima.

## 5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. pH vrijednost suspenzije u velikoj mjeri utječe na topljivost proteina te posljedično na količinu otopljenih proteina u suspenziji. Samim time očitana je i manja apsorbancija na UV/VIS spektrofotometru. Proteini su najbolje topljivi pri pH 3 ( $c = 0,0704 \pm 0,0073$  mg/mL,  $A = 0,313 \pm 0,021$ ), a najslabija topljivost zabilježena je pri pH 5 ( $c = 0,02235 \pm 0,00105$  mg/mL,  $A = 0,175 \pm 0,003$ ) odnosno topljivost proteina najslabija je u blizini izoelektrične točke proteina, a veća što je pH dalji od vrijednosti izoelektrične točke.
2. Sposobnost pjenjenja najbolja je u blizini izoelektrične točke proteina zbog velikih elektrostatskih privlačenja između molekula proteina te zbog najmanjeg međusobnog odbijanja molekula čime je omogućeno lako apsorbiranje proteina na granici zrak/voda. Najbolja sposobnost pjenjenja proteina odnosno najveći postotak povećanja volumena pjene uočen je kod pH 5 (5 min:  $330,31 \pm 33,560$ , 10 min:  $317,35 \pm 8,075$ , 15 min:  $366,57 \pm 22,165$ ) te kod pH 7 (5 min:  $374,50 \pm 29,885$ , 10 min:  $308,12 \pm 8,165$ , 15 min:  $301,06 \pm 20,155$ ) gdje su najviše izražene protein-protein interakcije, a najslabija sposobnost pjenjenja zabilježena je za pH 9 (5 min:  $204,022 \pm 22,855$ , 10 min:  $168,20 \pm 11,530$ , 15 min:  $165,45 \pm 1,285$ ). Najveća stabilnost pjene uočena je oko izoelektričnog područja. Minimalna stabilnost pjene bila je najviša kod pH 3 (50'), a najmanja kod pH 9 (3'15").
3. Najveća moć adsorbiranja proteina na granici voda/ulje očitana je kod pH 7 (IAE = 934,8695), a najmanja kod pH 9 (794,8837). Iako su sve očitane vrijednosti indeksa aktiviteta emulzije bile zadovoljavajuće (pH 3 = 905,1150, pH 5 = 915,7252, pH 7 = 934,8695, pH 9 = 794,8837), indeksi stabilnosti emulzije pokazali su se jako niskima (pH 3 = 0,4021, pH 5 = 0,1908, pH 7 = 0,7588, pH 9 = 1,3080), što je bilo vidljivo i tijekom samog pokusa budući da su se već nakon nekoliko minuta slojevi odvojili. Iz toga je moguće zaključiti da pH vrijednost utječe i na sposobnost stvaranja te stabiliziranja emulzija, odnosno što je pH dalji od vrijednosti izoelektrične točke, to je emulzija bila stabilnija. Najveća stabilnost emulzija pokazala se kod pH 9 (1,3080).
4. Najmanja sposobnost proteina da vežu vodu uočena je u blizini izoelektrične točke gdje su protein-protein interakcije nadjačale protein-voda interakcije, tako da je najveća sposobnost vezanja vode uočena kod pH 9 ( $3,4830 \pm 0,0959$  g/g), a najmanja sposobnost

vezanja vode zabilježena je kod pH 5 ( $1,6133 \pm 0,01115$  g/g) zbog manje količine neto naboja odnosno jakih protein-protein interakcijama pri pH 5.



## 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 (2022) *Vicia faba*. [https://en.wikipedia.org/wiki/Vicia\\_faba](https://en.wikipedia.org/wiki/Vicia_faba). Pristupljeno 1.8.2022.

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

Božić A (2021) Funkcionalna svojstva biljnih proteina i aspekt održive primjene (znanstveni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Cepeda E, Villaran MC, Aranguiz N (1998) Functional properties of faba bean (*Vicia faba*) protein flour dried by spray drying and freeze drying. *J Food Eng*, **36** (3), 303-310. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(98\)00061-2](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(98)00061-2)

Cherry JP, McWatters KH (1981). Whippability and aeration. U:Cherry JP (ured.) Protein Functionality in Foods, American Chemical Society, Washington, D. C., str. 149-176.

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

Crepon K, Marget P, Peyronnet C, Carrouee B, Arese P, Duc G (2010) Nutritional value of faba bean (*Vicia faba* L.) seeds for feed and food. *Field Crops Res*, **115** (3), 329-339. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.09.016>

Dhull SB, Kidwai MK, Noor R, Chawla P, Rose PK (2021) A review of nutritional profile and processing of faba bean (*Vicia faba* L.). *Legum Sci*. <https://doi.org/10.1002/leg3.129>

Duc G (1997) Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Res*, **51** (1-3), 99-109. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(97\)00025-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00025-7)

Felix M, Lopez-Osorio A, Romero A, Guerrero A (2018) Faba bean protein flour obtained by densification: A sustainable method to develop protein concentrates with food applications. *LWT- Food Sci Techno*, **93**, 563-569. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.078>

Gimenez MA, Drago SR, De Greef D, Gonzales RJ, Lobo MO, Samman NC (2012) Rheological, functional and nutritional properties of wheat/broad bean (*Vicia faba*) flour blends for pasta formulation. *Food Chem*, **134** (1), 200-206. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.093>

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

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>

Karaca AC, Low N, Nickerson M (2011) Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Res Int*, **44** (9), 2742-2750. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.012>

Keivaninahr F, Gadkari P, Benis KZ, Tulbek M, Ghosh S (2021) Prediction of emulsification behaviour of pea and faba bean protein concentrates and isolates from structure– functionality analysis. *RSC Adv*, **11**, 12117-12135. <https://doi.org/10.1039/D0RA09302E>

Kirk WDJ (2004) Faba bean: *Vicia faba*. *Bee world*, **85** (3), 60-62. doi: 10.1080/0005772X.2004.11099625

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>

Lea EJ, Crawford D, Worsley A (2006) Public views of the benefits and barriers to the consumption of a plant-based diet. *Eur J Clin Nutr*, **60**, 828-837. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602387>

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>

Lopez-Bellido FJ, Lopez-Bellido L, Lopez-Bellido RJ (2005) Competition, growth and yield of faba bean (*Vicia faba* L.). *Eur J Agron*, **23** (4), 359-378. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2005.02.002>

Mao X, Hua Y (2012) Composition, Structure and Functional Properties of Protein Concentrates and Isolates Produced from Walnut (*Juglans regia* L.). *Int J Mol Sci*, **13**, 1561-1581. doi:10.3390/ijms13021561

Mariotti F (2017) Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease, Academic Press, Cambridge, USA.

Mortuza G, Hannan A, Tzen J (2009) Chemical composition and functional properties of *Vicia faba* L. from Bangladesh. *Bangl J Bot*, **38**, 93-97. <https://doi.org/10.3329/bjb.v38i1.5129>

Nivala O, Nordlund E, Kruus K, Ercili-Cura D (2020) The effects of heat and transglutaminase treatment on emulsifying and gelling properties of faba bean protein isolate. *Food Sci Technol*, **139**, 110517. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110517>

Ostfeld RJ (2017) Definition of a plant-based diet and overview of this special issue. *J Geriatr Cardiol*, **14**, 315. doi: 10.11909/j.issn.1671-5411.2017.05.008

Richter CK, Skulas-Ray AC, Champagne CM, Kris-Etherton PM (2015) Plant protein and animal proteins: do they differentially affect cardiovascular disease risk? *Adv Nutr*, **13** (6), 712. doi: 10.3945/an.115.009654

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 Tech*, **67**, 27–36.

Samei SP, Ghorbani M, Tagliazucchi D, Martini S, Gotti R, Themelis T, i sur. (2020) Functional, nutritional, antioxidant, sensory properties and comparative peptidomic profile of faba bean (*Vicia faba*, L.) seed protein hydrolysates and fortified apple juice. *Food Chem*, **330**, 127120. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127120>

Singh AK, Bharati RC, Manibhushan NC, Pedpati A (2013) An assessment of faba bean (*Vicia faba* L.) current status and future prospect. *Afr J Agric Res*, **8** (50), 6634-6641. doi: 10.5897/AJAR2013.7335

Singhal A, Stone AK, Vandenberg A, Tyler R, Nickerson MT (2016) Effect of genotype on the physicochemical and functional attributes of faba bean (*Vicia faba* L.) protein isolates. *Food Sci Biotechno.*, **25**, 1513–1522. doi: 10.1007/s10068-016-0235-z

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>

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

Tolstoguzov VB (1991) Functional properties of food proteins and role of protein polysaccharide interaction. *Food Hydrocoll*, **4** (6), 429-468. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80196-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80196-3)

Vininen M (2020) Solubility of proteins. *ADMET&DMPK*, **8** (4), 391-399. doi: <http://dx.doi.org/10.5599/admet.831>

Webb MF, Naeem HA, Schmidt KA (2002) Food Protein Functionality in a Liquid System: A Comparison of Deamidated Wheat Protein with Dairy and Soy Proteins. *J Food Sci*, **67** (8), 2896-2902. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08835.x>

Zayas JF (1997) *Functionality of Proteins in Food*, Springer, Verlag, Berlin, Heidelberg, str. 77-133.

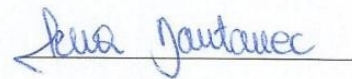
Zayas JF (1997) *Functionality of Proteins in Food*, Springer, Verlag, Berlin, Heidelberg, str. 135-227

Zayas JF (1997) *Functionality of Proteins in Food*, Springer, Verlag, Berlin, Heidelberg, str. 260-309

Zayas, JF (1995) Foaming Properties of Selected Plant and Animal Proteins. *J Food Sci*, **60** (5), 1025-1028. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb06285.x>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja TENA DAUTANEC 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.



Vlastoručni potpis