



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET  
FARMACEUTSKO INŽENJERSTVO



# Nusproizvod agroindustrije – zeleno lišće: Novi izvor proteina i bioaktivnih jedinjenja

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

dr Ljiljana Popović, vanredni profesor

Kandidat:

Tea Sedlar, mast. inž.

Novi Sad, 2022. godine

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA<sup>1</sup>

Vrsta rada:	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora:	Tea Sedlar
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	dr Ljiljana Popović, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad
Naslov rada:	Nusproizvod agroindustrije – zeleno lišće: Novi izvor proteina i bioaktivnih jedinjenja
Jezik publikacije (pismo):	Srpski (latinica)
Fizički opis rada:	Uneti broj: Stranica (182) Poglavlja (7) Referenci (414) Tabela (14) Slika (37)
Naučna oblast:	Tehnološko inženjerstvo
Uža naučna oblast (naučna disciplina):	Enzimsko inženjerstvo
Ključne reči / predmetna	Nusproizvodi agroindustrije, ekstrakcija, biljni proteini, funkcionalne osobine proteina, biološki aktivna jedinjenja,

<sup>1</sup> Autor doktorske disertacije potpisao je i priložio sledeće:

5 – Izjava o autorstvu;

5v – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije i o ličnim podacima;

5g – Izjava o korišćenju.

Ove Izjave se čuvaju na fakultetu u štampanom i elektronskom obliku i ne koriče se sa tezom.

odrednica:	proteini lišća, <i>in vitro</i> digestija
Rezime na jeziku rada:	<p>U okviru ove doktorske disertacije istraživanja su bazirana na ekstrakciji proteina iz nusproizvoda prerade povrća – zelenog lišća, sa ciljem ispitivanja njihovih funkcionalnih i bioloških karakteristika, kao i razvoja novih formulacija prehrambenih proizvoda na bazi ovih proteina. Akcenat je stavljen na valorizaciju nusproizvoda agroindustrije koji nastaju nakon uzgoja i branja povrća u cilju dobijanja novih proteina.</p> <p>Istraživanja su sprovedena na proteinima dobijenih iz lišća karfiola, brokolija, kupusa i cvekle. U prvoj fazi istraživanja, dobijeni proteini lišća primenom alkalne ekstrakcije iskarakterisani su u pogledu funkcionalnih i bioloških osobina, ispitana je njihova svarljivost kao i antioksidativni potencijal dobijenih hidrolizata.</p> <p>U drugoj fazi, istraživanja su bazirana na unapređenju procesa ekstrakcije proteina lišća primenom ultrazvučnog i enzimskog predtretmana, a efikasnost ekstrakcije praćena je ispitivanjem funkcionalnih i fizičkih karakteristika dobijenih proteina lišća.</p> <p>U trećoj fazi, istraživanja su sprovedena sa fokusom na ugradnju proteina lišća brokolija kao funkcionalnog dodatka u prehrambeni matriks sa ciljem dobijanja novog proizvoda, i ispitivanja njegovih fizičko – hemijskih, strukturnih i senzornih osobina, <i>in vitro</i> digestije i antioksidativnog potencijala nakon varenja.</p> <p>Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji čine naučno saznanje o primeni tehnika za ekstrakciju proteina iz zelenog lišća, a takođe i o dobijanju prehrambenih proizvoda unapređenih bioloških i nutritivnih osobina koji mogu odgovoriti na sve veće zahteve i potrebe potrošača za funkcionalnom hranom.</p>
Datum prihvatanja teme od strane nadležnog veća:	06.04.2021.
Datum odbrane: (Popunjavanje odgovarajuća služba)	

Članovi komisije: (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	Predsednik: dr Jadranka Fraj, docent, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad  Član (mentor): dr Ljiljana Popović, vanredni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad  Član: dr Jelena Tomić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Novom Sadu, Naučni institut za prehrambene tehnologije Novi Sad
Napomena:	

**UNIVERSITY OF NOVI SAD**  
**FACULTY OF TECHNOLOGY**

**KEY WORD DOCUMENTATION<sup>2</sup>**

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Tea Sedlar
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	dr Ljiljana Popović, associate professor, Faculty of Technology Novi Sad
Thesis title:	Agroindustry by-product – green leaves: A new source of protein and bioactive compounds
Language of text (script):	Serbian language (latin)
Physical description:	Number of: Pages (182) Chapters (7) References (414) Tables (14) Illustrations (37)
Scientific field:	Technological Engineering
Scientific subfield (scientific discipline):	Enzymatic engineering
Subject, Key words:	Agroindustry by-products, extraction, plant proteins, functional properties of proteins, biologically active compounds, leaf proteins, <i>in vitro</i> digestion

---

<sup>2</sup> The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

<p>Abstract in English language:</p>	<p>The research of this doctoral dissertation, was based on the extraction of proteins from the by-products of vegetable processing - green leaves, with the aim of examining their functional and biological characteristics, as well as the development of new formulations of food products based on these proteins. Emphasis is placed on the valorization of by-products of the agroindustry that are created after growing and picking vegetables in order to obtain new proteins.</p> <p>Research was conducted on proteins obtained from the leaves of cauliflower, broccoli, cabbage and beets. In the first phase of the research, leaf proteins obtained using alkaline extraction were characterized in terms of functional and biological properties, their digestibility was examined, as well as the antioxidant potential of the obtained hydrolysates.</p> <p>In the second phase, research is based on the improvement of the leaf protein extraction process using ultrasonic and enzymatic pretreatment, and the efficiency of the extraction is monitored by examining the functional and physical characteristics of the obtained leaf proteins.</p> <p>In the third phase, research was conducted with a focus on the incorporation of broccoli leaf protein as a functional additive in the food matrix with the aim of obtaining a new product, and testing its physical-chemical, structural and sensory properties, in vitro digestion and antioxidant potential after digestion.</p> <p>The results presented in this doctoral dissertation constitute scientific knowledge about the application of techniques for extracting protein from green leaves, and also about obtaining food products with improved biological and nutritional properties that can respond to the increasing demands and needs of consumers for functional food.</p>
<p>Accepted on Scientific Board on:</p>	<p>06.04.2021.</p>
<p>Defended: (Filled by the faculty service)</p>	

<p>Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)</p>	<p>President: dr Jadranka Fraj, assistant professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>Member (supervisor): dr Ljiljana Popović, associate professor, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>Member: dr Jelena Tomić, senior research associate, University of Novi Sad, Institute of Food Technology Novi Sad</p>
<p>Note:</p>	

## **Spisak publikacija proisteklih iz rada na doktorskoj disertaciji:**

### **M21 Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu**

- Sedlar T., Čakarević J., Tomić J., Popović Lj.: Vegetable by-products as new sources of functional proteins, *Plant Foods for Human Nutrition*, 2020, vol 75, pp 1-6. doi:10.1007/S11130-020-00870-8



## Sadržaj

1. Uvod .....	1
3. Pregled literature .....	6
3.1. Nusproizvodi agroindustrije – potencijalni izvor visoko vrednih jedinjenja.....	6
3.1.1.Otpadni materijali useva .....	7
3.1.2.Jedinjenja izolovana iz otpadnih sirovina useva.....	9
3.2. Poljoprivredni i nusproizvodi Brassica vrsta.....	13
3.3. Proteini.....	17
3.3.1.Alternativni izvori proteina.....	20
3.3.1.1.Biljni izvori proteina.....	20
3.3.1.1.1. Klasifikacija biljnih proteina.....	21
3.4. Proteini iz nusproizvoda .....	22
3.5. Proteini iz zelenog lišća kao nusproizvoda agroindustrije .....	24
3.5.1.Osobine zelenog lišća .....	26
3.5.1.1.Metode ekstrakcije proteina.....	27
3.6. Predtretmani u izolovanju proteina.....	32
3.6.1.Primena ultrazvuka kao predtretmana u izolovanju proteina .....	33
3.6.2.Enzimski predtretman .....	34
3.6.2.1. Enzimi i parametri koji utiču na ekstrakciju biomolekula.....	35
3.6.2.2. Enzimaska ekstrakcija proteina .....	37
3.8. Funkcionalne osobine proteina.....	41
3.9. Funkcionalne osobine povezane sa strukturom proteina i reologija.....	45
3.10.Funkcionalne osobine povezane sa površinskom aktivnosti proteina .....	48
3.10.Bioaktivni peptidi.....	54
3.11. <i>In vitro</i> digestija kao model sistem za ispitivanje svarljivosti .....	55
3.11.1.Koraci <i>in vitro</i> digestije .....	57
3.12.Biljni proteini i njihova višestruka industrijska primena.....	59
4. Materijal i metode.....	64
4.2.1.2. Hemijski sastav lišća.....	65

4.2.2. Postupci dobijanja proteina lišća – alkalnom ekstrakcijom, primenom ultrazvučnog predtretmana, primenom enzimskog predtretmana, i “scale - up” procesom .....	65
4.2.2.2. Dobijanje proteina lišća karfiola, brokolija, kupusa i cvekle primenom ultrazvučnog predtretmana .....	66
4.2.2.3. Dobijanje proteina lišća karfiola i brokolija primenom enzimskog predtretmana .....	66
4.2.2.6. Izolovanje i frakcionisanje proteina lišća prema Ozbornu .....	71
4.3. Hemijske analize u karakterizaciji proteinskih izolata dobijenih enzimskim predretmanom, i prehrambenog matriksa.....	71
4.3.1. Aminokiselinski sastav .....	71
4.4. Karakterizacija proteinskih izolata dobijenih alkalnom ekstrakcijom, primenom ultrazvučnog predtretmana i primenom enzimskog predtretmana i matriksa.....	72
4.4.1. Elektroforeza (SDS-PAGE) .....	72
4.4.2. Furije transformišuća infracrvena (FTIR) spektroskopija .....	72
4.5. Funkcionalna svojstva proteina lišća dobijenih – alkalnom ekstrakcijom, primenom ultrazvučnog predtretmana i primenom enzimskog predtretmana.....	73
4.5.1. Određvanje rastvorljivosti proteina.....	73
4.5.2. Kapacitet vezivanje vode i ulja .....	73
5. Rezultati i diskusija .....	81
5.1. Otpadno lišće kao novi izvor funkcionalnih i biološki aktivnih proteina.....	81
5.1.1. Izolovanje i karakterizacija proteina lišća.....	81
5.1.1.1. Hemijski sastav proteina lišća.....	82
5.1.1.2. Karakterizacija proteina lišća.....	85
5.1.1.2.1. SDS-PAGE .....	85
5.1.1.2.2. FTIR spektroskopija.....	87
5.1.1.3. Funkcionalne osobine proteina lišća.....	88
5.1.1.3.1. Rastvorljivost .....	88
5.1.1.3.2. Emulzione osobine.....	90
5.1.1.3.3. Sposobnost formiranja pene.....	91
5.1.1.3.4. Kapacitet vezivanja vode i ulja .....	93
5.1.2. Ispitivanje svarljivosti proteina lišća - In vitro digestija.....	95
5.1.2.1. Antioksidativna aktivnost proteina lišća nakon digestije.....	97
5.2.1. Ekstrakcija proteina lista primenom ultrazvučnog predtretmana .....	100

5.2.1. 1. Funkcionalne osobine proteina lišća dobijenih ultrazvučnim predtretmanom .....	102
5.2.1.1.1. Rastvorljivost .....	102
5.2.1.2. Unapređenje proteinskog prinosa primenom enzimskog predtretmana.....	103
5.2.1.2.1. Hemijski sastav .....	103
5.2.1.2.2. Uticaj koncentracije enzimskog kompleksa na ekstrakcioni prinos proteina .....	104
5.2.1.2.3. Karakterizacija proteina lišća dobijenih enzimskim predtretmanom.....	106
5.2.1.3.1. SDS-elektroforeza.....	107
5.2.1.3.2. FTIR spektrometrija proteina lišća dobijenih enzimskim predtretmanom .....	108
5.2.1.5. Funkcionalne osobine proteina lišća dobijenih enzimskim pretretmanom.....	114
5.3. Ugradnja proteina dobijenih iz otpadnog lišća brokolija u prehrambeni matriks.....	<b>118</b>
5.3.1. Nutritivni profil krepera.....	120
5.3.2. Fizičke karakteristike .....	123
5.3.4. <i>In vitro</i> digestija .....	128
5.3.6. Antioksidativna aktivnost nakon <i>in vitro</i> digestije.....	132
6. Zaključak.....	135
7. Literatura.....	141

## 1. Uvod

Naučni interes sve češće je usmeren na iskorišćenje nusproizvoda prehrambene industrije i njihovu valorizaciju za dobijanje visoko vrednih proizvoda. U pogledu bioodrživog razvoja i tehnologija obnovljivih resursa, nusproizvodi agroindustrije predstavljaju relativno jeftin izvor materijala koji je pogodan za proizvodnju bioaktivnih molekula, što bi sa jedne strane smanjilo količinu otpada i troškove koji su vezani sa odlaganjem istog, a sa druge strane postoji mogućnost za dobijanje nutritivno bogatih proizvoda. Prehrambeni otpad, uključujući i jestivu hranu i nejestive delove, procenjen je u Evropi na 100 miliona tona godišnje (od toga 9 miliona tona dolazi iz primarne proizvodnje) i direktno je povezan sa oko 143 milijarde evra troškova. Prema proceni Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO, 2015), očekuje se da će broj stanovnika na Zemlji u sledećih 40 godina porasti na 10 milijardi ljudi. Kako bi se obezbedile dovoljne količine kvalitetne hrane za rastuću populaciju neophodno je i odgovarajuće povećanje poljoprivredne proizvodnje. Pored toga, dodatni izazov predstavlja iznalaženje i upotreba novih izvora proteina.

Većina proteina koji se koriste u prehrambenoj industriji su životinjskog porekla, uključujući jaja, mleko i ribu. Povećana potrošnja ovih proteina doprinosi emisiji gasova staklene bašte, gubitku biodiverziteta i klimatskim promenama. U skladu sa tim visoka cena i dostupnost proteina životinjskog porekla, u mnogim zemljama, dovodi do upotrebe alternativnih izvora proteina, kao što su biljni proteini.

Interesovanje za biljne proteine, kao zamenu za životinjske, globalno se povećava zbog sve veće potražnje potrošača koja se može pripisati raznim faktorima (zdravstveni problemi, vegetarijanstvo, verska ograničenja). Među biljnim izvorima proteina mahunarke poput soje, sočiva i graška i dalje su najvažnija grupa, ali njihova prerada u različite proizvode ima određena ograničenja zbog antinutritivnih faktora. Sa druge strane, zelena biomasa iz lišća biljaka prepoznata je kao potencijalni izvor proteina za primenu u hrani na osnovu njenog nutritivnog profila i velike dostupnosti u tokovima poljoprivrednog otpada. Proteini otpadnog lišća smatraju se dodatnim izvorom proteina još od 1960-ih, a njihova karakterizacija, modifikacije i primena, u proteklih par decenija su predmet izučavanja mnogobrojnih naučnih radova.

Tokom procesa proizvodnje i konzumacije povrća, tona nusproizvoda, među kojima je i lišće raznih vrsta generiše se, svake godine, a njihovo nakupljanje utiče na zagađenje životne sredine što može da bude posledica njihovog organskog sastava i visokog sadržaja vlage. Otpadno lišće predstavlja potencijalni izvor novih proteina, a mogu da se koriste i u sistemima hrane i kao stočna hrana. Za upotrebu proteina lišća kao sastojaka u hrani, moraju posedovati osobinu svarljivosti, kao i da nakon varenja dolazi do proizvodnje hidrolizata (peptida) koji imaju određenu biološku funkciju. Dobijeni peptidi najčešće poseduju biološke aktivnosti kao što su antioksidativna, antihipertenzivna, kao i regulacije metabolizma glukoze. Takođe, dobre funkcionalne osobine kao i poželjne senzorne osobine kao što su boja, ukus, tekstura određuju njihovu upotrebu u funkcionalnoj hrani.

Primenom različitih fizičkih (ultrazvuk) i hemijskih (primena enzima) predtretmana može da se utiče na povećanje prinosa pri ekstrakciji proteina lišća. Ćelijski zid biljne ćelije predstavlja složenu strukturu koja može da otežava ekstrakciju proteina. Ekstrakcija podpomognuta enzimima predstavlja jednu od alternativnih metoda za dobijanje visoko kvalitetnih proteinskih koncentrata u pogledu njihovog prinosa takođe i u pogledu nutritivnih i funkcionalnih osobina. Da bi došlo do destrukcije ćelijskog zida koriste se različite karbohidraze i pektinaze koje bi dovele do oslobađanja proteina iz ćelije a samim tim se olakšava njihova ekstrakcija iz biljnog supstrata. Ova metoda spada u zelene tehnologije zbog blagih ekstrakcionih uslova i odsustva štetnog uticaja na životnu sredinu.

Istraživanja u oblasti biljnih proteina mogu se sumirati u dve osnovne strategije: obogaćivanje proteinima i komplementacija. Strategije za komplementaciju proteina su korišćene u raznim kombinacijama mešanja prehrambenih proizvoda sa nedostatkom esencijalnih aminokiselina sa drugim proizvodima koji obezbeđuju limitirajuće aminokiseline. Dodatno, senzorna i funkcionalna svojstva proteinskih izolata, brašna i koncentrata biljnog porekla, mogu se prilagoditi korišćenjem unapređenih strategija ekstrakcije i obrade. Na osnovu njihovog profila, ovi biljni proteini se koriste kao stabilizatori, emulgatori, agensi za strukturiranje i modifikatori teksture hrane za razvoj i obogaćenje nutritivnog sastava veganskih i vegetarijanskih proizvoda.

Posmatrajući primenu proteina sa različitih aspekata: kao biološki aktivnih jedinjenja, i kao dobrih funkcionalnih agenasa može se reći da imaju veliki potencijal za ugradnju u različite

prehrambene formulacije. Tako formulisan proizvod može da bude nutritivno bogat i da zadovoljava potrebe današnjeg potrošača u smislu zahteva za većim sadržajem proteina koji nisu životinjskog porekla, a u isto vreme da ima pozitivan uticaj na ljudsko zdravlje. Naučna istraživanja u skladu su sa potražnjom i kreiranjem inovativnih prehrambenih proizvoda, što sa jedne strane predstavlja veliki izazov u pogledu praćenja aktivnosti, stabilnosti i dostupnosti biološki aktivnih komponenata nakon direktnog konzumiranja, a sa druge strane doprinosi razvoju proizvoda koji su obogaćeni prirodnim komponentama, a prate zahteve modernog doba.

## 2. Cilj istraživanja

Cilj doktorske disertacije je dobijanje proteina, izolovanih iz nusproizvoda prepade povrća, sa iskarakterisanim funkcionalnim i biološkim osobinama i razvoj novih formulacija dodataka ishrani na bazi ovih proteina kao i njihova primena u funkcionalnoj hrani.

Naučna istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije omogućila su nova saznanja o valorizaciji nusproizvoda koji nastaju nakon branja ploda brokolija, karfiola, kupusa i cvekle, u cilju dobijanja visoko vrednih proteina.

Istraživanja su obuhvatila tri glavne faze:

### 1. Faza

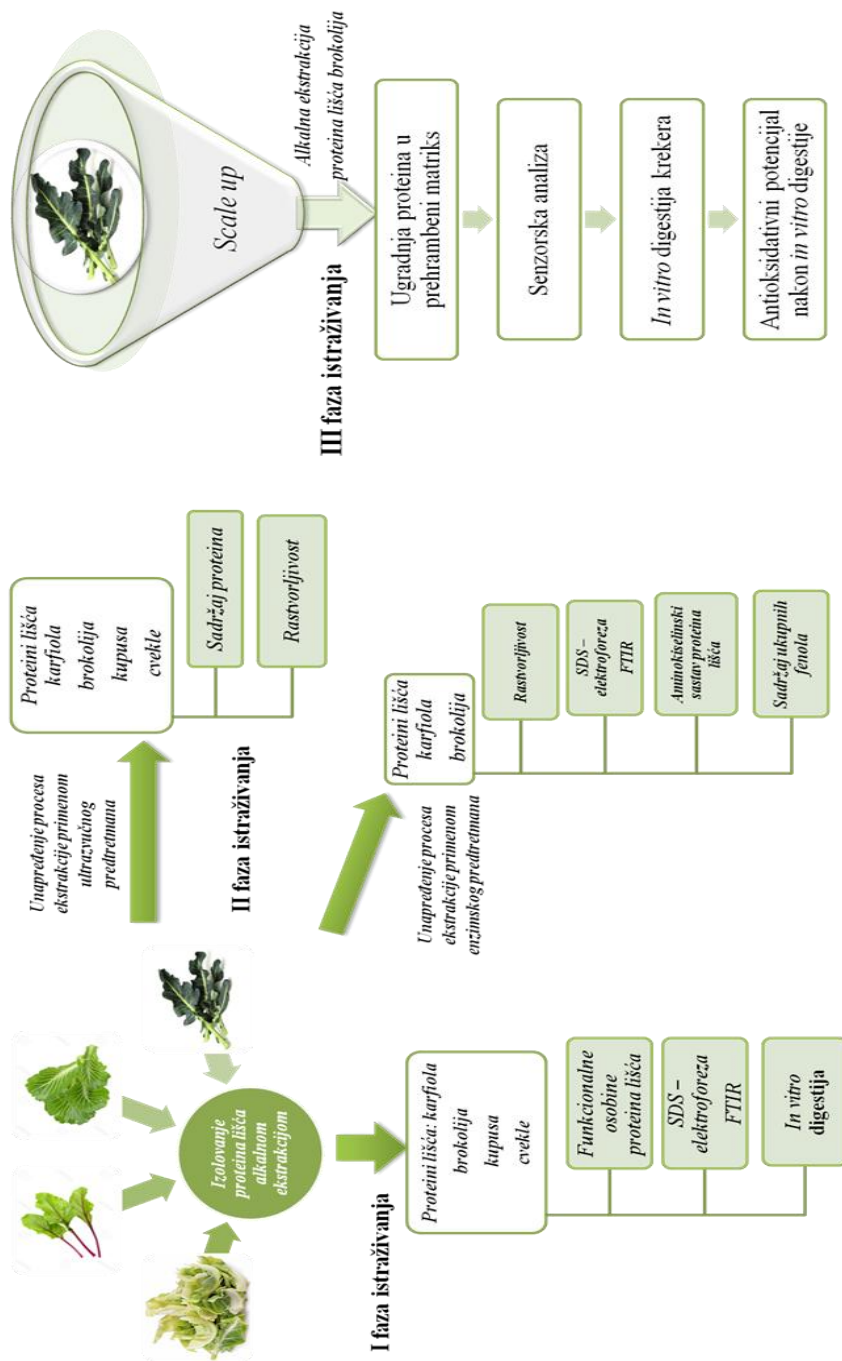
Definisanje novog izvora proteina i bioaktivnih jedinjenja: nusproizvod agroindustrije – zeleno lišće povrća. Ekstrakcija proteina iz otpadnog lišća povrća i njihova karakterizacija u pogledu fizicko-hemijskih i funkcionalnih osobina. Ispitivanje svarljivosti dobijenih proteina primenom modela *in vitro* digestije, kao i određivanje antioksidativnog potencijala dobijenih hidrolizata.

### 2. Faza

Unapređenje procesa ekstrakcije proteina i zelenog otpadnog lišća primenom različitih enzimskih i fizičkih predtretmana (ultrazvuk) u cilju povećanja proteinskog prinosa. Enzimski predtretmani obuhvatili su primenu enzima za razgradnju ćelijskog zida (celulaza, pektinaza). Ispitivanje fizičko-hemijskih i funkcionalnih osobina ovako dobijenih proteina lišća.

### 3. Faza

Ugradnja proteina iz lišća brokolija, kao najbolje pokazanog izvora, u prehrambeni matriks, kreker, u cilju dobijanja unapređenog funkcionalnog prehrambenog proizvoda. Karakterizacija dobijenog proizvoda - određivanje fizičko-hemijskih, senzorskih i teksturnih osobina, *in vitro* digestija i određivanje antioksidativnog potencijala hidrolizata nakon digestije.



Slika 1. Šematski prikaz faza istraživanja doktorske disertacije



### 3. Pregled literature

#### 3.1. Nusproizvodi agroindustrije – potencijalni izvor visoko vrednih jedinjenja

*Biljni otpad jedan je od nusproizvoda agroindustrije koji nastaje tokom proizvodnje i prerade prehrambenih sirovina. Njegovo nakupljanje dovodi do značajnog zagađenja životne okoline, a samim tim i do nezdrave društvene sredine. Postoji urgentna potreba za razvijanjem metoda za iskorišćenje ovakve vrste otpada u visoko vredna jedinjenja ili materijale. Mnoga naučna istraživanja se uspešno bave ovim oblastima, a razvijeno je i nekoliko strategija za proizvodnju biohemikalija iz biološkog otpada. Drugim rečima, otpadni materijal useva sve više dobija na vrednosti. Jedinjenja poput ugljenih hidrata, minerala, proteina i drugih izolovana su iz raznog otpadnog materijala koji zaostaje na usevima. U ovom poglavlju prikazan je pregled nusproizvoda agroindustrije kao izvora visoko vrednih jedinjenja, zelenog lišća kao nusproizvoda agroindustrije, molekula koje su iz njih izolovane, njihovih metoda ekstrakcije i načina na koji se dalje dobijaju vredna jedinjenja.*

Proizvodnja žitarica, povrća, voća i srodnih dobara predstavlja osnovne komponente poljoprivrednih kultura. Opstanak ljudske vrste direktno je povezan sa poljoprivrednom proizvodnjom. Prisutna je sve veća potražnja za pametnom poljoprivredom, a u bliskoj je vezi sa sve većim brojem stanovnika. Drugi važan aspekt u poljoprivrednoj proizvodnji je dovođenje poljoprivrede u okvire cirkularne ekonomije (Martin i sar., 2017; Heshmati, 2015). Agroindustrijski nusproizvodi i otpad stvaraju sve veće ekološke posledice širom sveta. Da bi se zadovoljila sve veća potreba za hranom, tradicionalni metod poljoprivrede pretvoren je u modernu metodu kojoj je upotreba đubriva, prekomerno korišćenje podzemnih voda, prekomerna upotreba pesticida i još mnogo toga doprinosi ugrožavanju životne sredine (Sadh i sar., 2018). Negativan ekološki uticaj ima i zbog nedovoljno iskorišćenog i netretiranog agroindustrijskog otpada koji se uglavnom neplanski i nekontrolisano spaljuje. Ovo je primoralo naučnike iz različitih oblasti da se udruže i predlože adekvatan način za iskorišćenje agroindustrijskih nusproizvoda i otpada (Couto, 2008; Rudra i sar., 2015; Okonko i sar., 2009; Charoensit i sar., 2021).

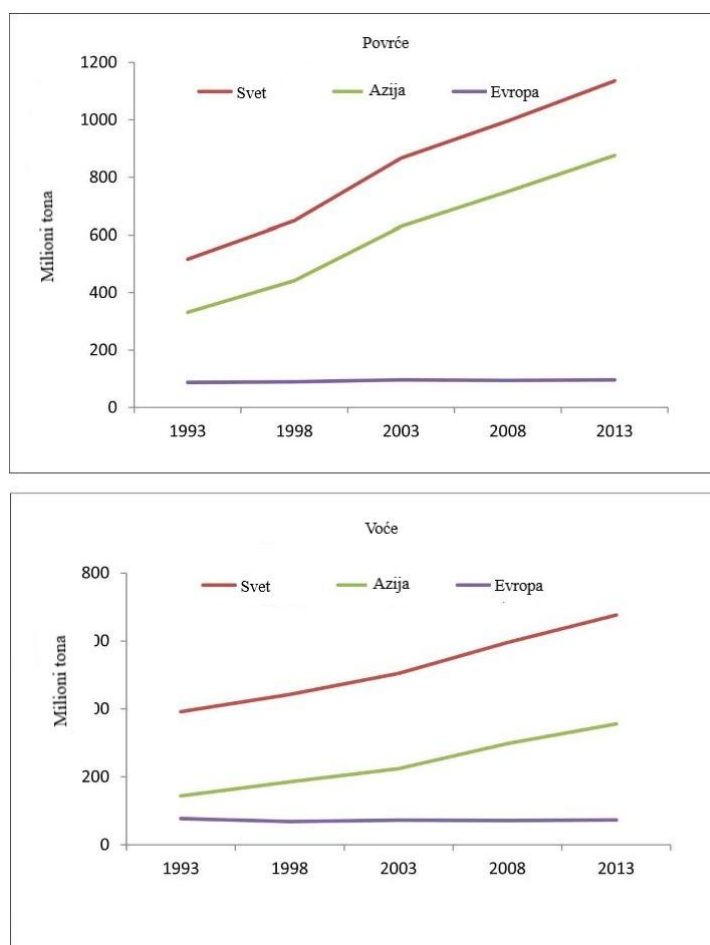
Poljoprivredni otpad obuhvata životinjski otpad, otpad od useva, otpad od prerade i opasan otpad (Nagendran, 2011). Otpad koji potiče od poljoprivrednih useva pokazao je svoj potencijal kao odličan izvor visoko vrednih jedinjenja poput onih koji imaju nutritivnu vrednost, farmaceutski značaj itd. (Sadh i sar, 2018; Graminha i sar., 2008; Adamez i sar., 2012; Katalinic i sar., 2010; Singh i Geetanjali., 2013). Nepotrošeni i neiskorišćeni delovi povrća, voća i drugih poljoprivrednih proizvoda predstavljaju agroindustrijski otpad. Glavni faktori koji doprinose agroindustrijskom otpadu iz useva su kore i pulpe od sokova i pića u industriji (Samuel i sar., 2019), ljuske od žitarica, oraha, indijskog oraha u industriji (Goodman, 2020; Piraiesh i sar., 2012; Panouille i sar., 2007), pulpa kafe iz industrije kafe (Figueroa i sar., 2016; Murthi i Naidu, 2012). Zabeleženo je da se oko 25%–30% otpadnog materijala od useva generiše samo kroz povrće i voće (Ajila i Rao, 2013; Laufenberg i sar., 2009). Oni su bogati celulozom, hemicelulozom, ligninom, enzimima, proteinima i drugim organskim molekulima (Sharanappa i sar., 2011; Sindiri i sar., 2013; Sukan i sar., 2014; Topakas i sar., 2004; Sagar i sar. , 2018).

Iz poljoprivrednog otpada izdvojene su vredne materije, koje su u skladu sa principima zelene hemije, tako da se otpad od useva može posmatrati kao održiva sirovina za izolovanje bioaktivnih jedinjenja. Kao neki od primera mogu se navesti: fenolna jedinjenja, polifenoli, antioksidansi koji su izolovani iz semena urme (Al-Farsi i Lee, 2008), otpada od kore citrusa (Balasundram et al., 2006) i kore jabuke (Wolfe i Liu, 2003). Kožice i semenke grožđa su bogati izvori proantocijanidinima (Torres i Bobet, 2001). Flavanoni i pektini su izolovani iz eteričnih ulja dobijenih kao nusproizvod iz industrije sokova od citrusa (Waldron, 2009). Komina paradajza je bogat izvor likopena i karotena, a izolovani su ekstrakcijom sa superkritičnim CO<sub>2</sub> (Baysal et al., 2000).

### 3.1.1. Otpadni materijali useva

Kako bi se zadovoljila potražnja stanovništva za hranom, u poslednje dve decenije došlo je do povećanja proizvodnje voća i povrća, sa globalnih oko 980 miliona tona u 1993. na 1.800 miliona tona u 2013. (FAO, 2015.) (Slika 2), uz značajno povećanje proizvodnje u Aziji. Ova promena rezultirala je stvaranjem velikih količina otpada i nusproizvoda, koji često čine značajan deo sirovine, od 10 - 60% sve u zavisnosti od biljne vrste. Godine 2011 Sjedinjene Države i Kina proizvele su preko 45 miliona tona otpada od voća i povrća (Wadhva i sar., 2013). Najveća količina otpada obično nastaje tokom žetve, tj. poljoprivrednih ostataka (npr. lišće,

stabljike) i u prehrambenoj industriji (komina, kora ili semenke od jabuke, grožđa i citrusa) (Madurvar i sar., 2013). U prošlosti su se ovi otpadni materijali obično koristili kao đubrivo ili stočna hrana (Laufenberg i sar., 2003). Poslednjih godina, međutim, razvijeno je nekoliko novih metoda za korišćenje ovih otpadnih proizvoda u cilju dobijanja proizvoda veće dodatne vrednosti (Laufenberg i sar., 2003). Literaturni podaci raspoložu informacijama da su ovi nusproizvodi dobar izvor bioaktivnih jedinjenja, npr. 26 fenolnih jedinjenja, glukozinolata,  $\beta$ -karotena, vitamin C, vitamin E, arome, boje i dijetetska vlakna, kao i selen i cinka (Shilpi i sar., 2013).



Slika 2. Proizvodnja povrća i voća u poslednje dve decenije (FAO, 2015)

Ratarska proizvodnja u poslednjih pet decenija povećana je više od tri puta zajedno sa povećanjem broja stanovnika. Zelena revolucija i seča šuma su dva važna faktora koja ljudi koriste za povećanje proizvodnje poljoprivrednih kultura (Food and Agriculture Organisation, 2017, 2019). Međutim, proces od farme do prehrambenog proizvoda, nažalost, dovodi do

stvaranja velikih količina nusproizvoda i otpada od useva. U celom lancu snabdevanja hranom, hrana se rasipa usled neodgovornosti pojedinca kao i lošeg upravljanja otpadom. Na globalnom nivou oko 24 miliona tona hrane godišnje obezbeđuje poljoprivredni sektor (Food and Agriculture Orga, 2017). Iako je poljoprivredni sektor važan deo našeg društva, ipak ne može da se zanemari njegov štetni uticaj na životnu sredinu.

Najistaknutiji razlozi za povećanje otpada od useva su neodgovornost, neznanje i nedovoljno informacija o upravljanju otpadom. Aktivnosti kao što su loš transport, nedostatak skladišnih objekata, kvarenje useva, kuhinjske aktivnosti i lokalne pijace povrća su neki od razloga za stvaranje i gomilanje otpada iz useva (Klich, 2007).

Poljoprivredni biljni otpad uglavnom je grupisan u tri kategorije:

- ostaci useva (koji se stvaraju tokom branja),
- agroindustrijski ostaci (generisani u vremenu nakon branja) i
- kuhinjski otpad (koji se generiše tokom potrošnje).

Ostaci tokom i nakon branja uglavnom obuhvataju nejestive delove useva koji se izbacuju kao otpadni materijal kao što su slama, strnište, stabljike, lišće, korenje, granje, itd. A oni uglavnom potiču od semena, voća, žitarica, povrća, itd. Otpad od useva uključuje ljuske, kore, prašinu, slamke, lišće, kominu, kore povrća i voća i žitarice koje nastaju prilikom prerade sirovina u proizvod za konzumaciju. Podaci u literaturi prikazuju da papaja proizvodi oko 53% otpada svog finalnog proizvoda koji uključuje 8,5% otpada od kore, 6,5% semena i 32% neupotrebljive pulpe. Otprilike 48% ukupnog ananasa nastaje kao otpad, odnosno 14% kora, 9% jezgra, 15% pulpa i 5% vrh. Preradom manga nastaje oko 11% kore, 13% semena, 18% neoperabilne pulpe, odnosno ukupno 58% gotovih proizvoda (Joshi i sar., 2012; Zavala et al., 2010a).

### 3.1.2. Jedinjenja izolovana iz otpadnih sirovina useva

Jedinjenja izolovana iz poljoprivrednog otpada uključuju mono-, di-, oligo- i polisaharide, proteine, jedinjenja prirodnih aroma i druge sekundarne fitokemikalije kao što su fenoli (Torres i sar., 2020; Li i Zhu, 2017; Ferraz i sar., 2019; Nakthong i sar., 2017; Kaur i sar., 2004; Sandhu i Lim, 2008). Kore citrusa i ostaci iz industrije sokova su dobri izvori flavanona dobijenih nakon alkaline ekstrakcije i dalje neutralizacije (Waldron, 2009). Kore agruma su korišćene kao

sirovina za izolovanje hesperidina, naringenina, narirutina (Coll. i sar., 1998) i pektina (Ralet i sar., 2005; Wang i sar., 2014). Antocijanini su dobijeni iz kore grožđa (Corrales i sar., 2008).

Krompir je dobro poznata prehrambena kultura koja dodaje veliku količinu poljoprivrednog otpada i izvor hemikalija poput skroba, amiloze, proteina i minerala (Sindiri i sar., 2013). Otkriveno je da je otpadni deo manga, uglavnom jezgra, bogat skrobom, a varijacija u hemijskom sadržaju je primećena jer hemijski sadržaj zavisi od sredine u kojoj se biljka uzgaja. Muniz-Valensija et al. godina su izolovali šećere iz otpada industrije manga i pretvorili ih u 5-hidroksimetilfurfural (HMF) u hidrotermalnim uslovima (Valencia i sar., 2020). Upotreba vode kao rastvarača i mikrotalasne pećnice kao izvora grejanja čine ovaj proces ekološki prihvatljivim i u skladu je sa principima zelene hemije.

Mango je odličan izvor ketoheksoza (15 g/100 g svežeg voća). Ugljeni hidrati poput saharoze, fruktoze i glukoze prisutni su u oko 50%, 33%, odnosno 17%, respektivno (Zafar i Sidhu, 2017). Kore krastavca od biljnog otpada su korišćene za izolovanje flavonoida u industrijske svrhe (Agarwal i sar., 2012). Primeri dati u Tabeli 1 potvrđuju da je otpad od poljoprivrednih useva odličan rezervoar bioaktivnih jedinjenja. Bez sumnje, odgovarajuća optimizacija metoda za hemijsko izolovanje sa komercijalnom održivošću može zameniti petrohemijske sirovine. Spisak reprezentativnih useva, njihov otpad-ostatak i izolovane hemikalije sastavljen je u Tabeli 1.

Biljni izvor	Otpadni materijal	Izolovana jedinjenja (%)	Literatura
Anato	Seme	Amiloza (24%) Skrob (66%)	<i>Silveira i Blacido, 2018</i>
Avokado	Seme	Skrob (27.5 – 29.8%)	<i>Lacerda i sar., 2014; Guerrero i sar., 2016</i>
Avokado	Seme i kora	Epikatehin, katehini, galna kiselina, hlorogenska kiselina	<i>Deng i sar., 2012</i>
Banana (nezrela)	Kora	Skrob (29%)	<i>Franklin i sar., 2017</i>
Brokoli	Lišće	Proteini (57%)	<i>Sedlar i sar., 2020</i>

Biljni izvor	Otpadni materijal	Izolovana jedinjenja (%)	Literatura
Banana	Kora	Galokatehini, antocijanini, delfinidin, cijanidin, kateholamini	<i>Someya i sar., 2002; Kanazawa i Sakakibara, 2000; Montelongo i sar., 2010</i>
Cvekla	Lišće	Proteini (54%)	<i>Sedlar et al., 2020</i>
Grožđe	Seme i kožica	Kafena kiselina, ferulinska kiselina, hlorogenska kiselina, p-hidroksi benzoična kiselina, vanilinska kiselina, galna kiselina	<i>Negro i sar., 2003; Maier i sar., 2009</i>
Grožđe	Kožica	Antocijanini	<i>Corrales i sar., 2008</i>
Jabuka	Nezrele jabuke	Amiloza (26 – 29.3%) Skrob (44 – 53%)	<i>Stevenson i sar., 2006</i>
Jabuka	Sušena jabuka	Pektin (10 – 15%)	<i>Ralet i sar., 2005</i>
Jabuka	Komina	Ugljeni hidrati (48 – 62%)	<i>Bhushan i sar., 2008</i>
Ječam	Mekinje	$\beta$ - Glukan	<i>Sainvitu i sar., 2012</i>
Ječam	Istrošeno zrno	Lizin (2,52%), Leucin (0,30%)	<i>Farcas i sar., 2017</i>
Karfiol	Lišće	Proteini (72%)	<i>Sedlar i sar., 2020</i>
Kasava	Pulpa	Ugljeni hidrati (69,9%)	<i>Sritoth i sar., 2000</i>
Kukuruz	Oštećena zrna kukuruzna	Maltoza (20,6%)	<i>Shehzad i sar., 2018</i>
Kupus	Lišće	Proteini (65%)	<i>Sedlar i sar., 2020</i>
Mango	Brašno semena	Skrob (44.9), Amiloza (9.1–16.3)	<i>Kaur i sar., 2004</i>
Mango	Kora	Fenolne komponente, karotenoidi, vitamin C, dijetska vlakna	<i>Zavala i sar., 2010b</i>

Biljni izvor	Otpadni materijal	Izolovana jedinjenja (%)	Literatura
Paradajz	Komina	Carbohydrates (25.4–50)	<i>Valle i sar., 2006</i>
Pirinač	Mekinje	Ulje (20.4)	<i>Kuk i Dowd, 1998</i>
Pšenica	Mekinje i klice	Fenolna kiselina, antioksidansi	<i>Wang i sar., 2008</i>
Šargarepa	Kora	Fenoli, $\beta$ -caroten	<i>Chantaro i sar., 2008</i>
Soja	Seme	Ulje (10–20)	<i>Diers i sar., 1992; Hwang i sar., 2014</i>
Sojina sačma	Otpadna sačma	Proteini (45.55), Ugljeni hidrati (38.40)	<i>Gerliani i sar., 2020</i>
Zeleni čaj	Lišće	Katehin	<i>Chang i sar., 2000</i>
Zeleni čaj	Lišće	Kofein (97)	<i>Uzunalic i sar., 2004b</i>

*Tabela 1. Poljoprivredni usevi, njihov otpad i izolovana jedinjenja*

Cvekla je tradicionalno i popularno povrće u mnogim delovima sveta. Bogata je vlaknima, kao i šećerima ali sa umerenom kalorijskom vrednošću. Od vitamina sadrži B vitamine (B1, B2, B3, B6) kao i folnu kiselinu. Listovi cvekle se najčešće odsecaju od lukovice i služe kao hrana za životinje, ili se odlažu kao otpad. Listovi cvekle imaju veći sadržaj flavonoida i fenola nego plod, ali se nedovoljno koriste zbog nedostatka odgovarajućeg znanja, posebno o njihovoj hranljivoj vrednosti i načinu pripreme (Ana Paula Ribeiro Barcelos de Castro, 2019). Superkritičnom ekstrakcijom otpadnog lišća cvekle, na niskoj temperaturi (35 °C) i pri pritisku CO<sub>2</sub> od 400 bara, dobija se ekstrakt sa visokom antioksidativnom aktivnosti (Rosario Goyeneche i sar., 2020).

### 3.2. Poljoprivredni i nusproizvodi Brassica vrsta

Najčešće uzgajanje Brassica vrste su karfiol, kupus i brokoli:

Karfiol (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) je jedna od kupusnjača koje se konzumiraju širom sveta. Njegov uzgoj i konzumacija su se naglo povećale u poslednjih nekoliko godina jer je dokazano da sadrži izvesne količine zdravstveno korisnih jedinjenja, kao što su fenoli, glukozinolati, proteini i vitamini. Zbog povećane proizvodnje nastaju i tone nusproizvoda karfiola (stabljike i lišća).

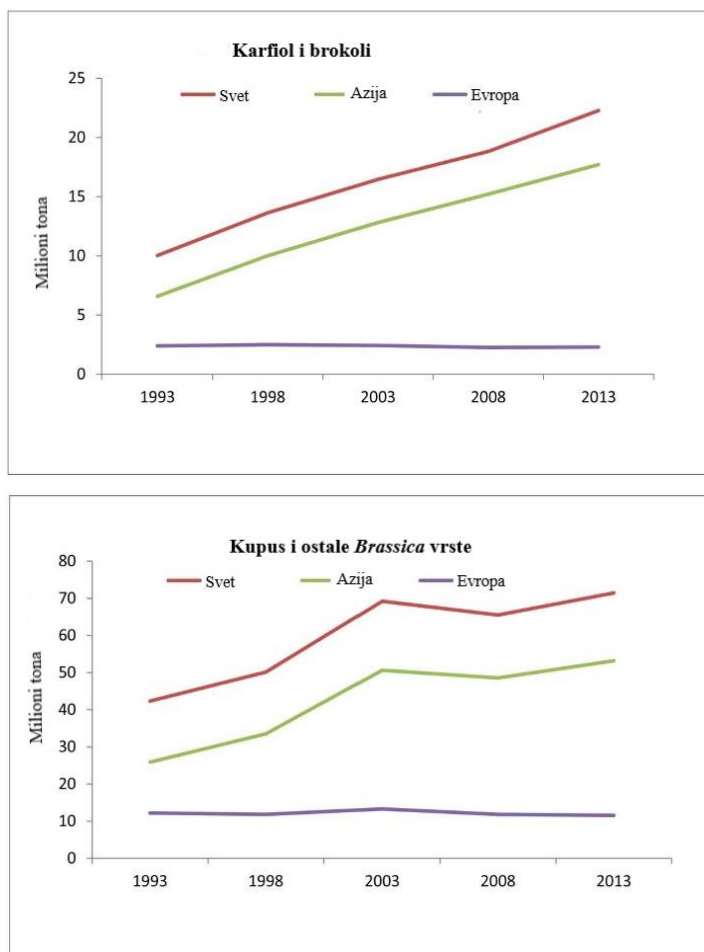
Kupus (*Brassica oleracea* var. *capitata*) se smatra super hranom zbog velikog sadržaja kalcijuma, folata, riboflavina, vitamina C, K i A i fitohemijskog sadržaja. Jedno je od povrća koje se najviše konzumira uz minimalnu preradu. Tokom same prerade uklanja se oko 40% mase, a obuhvata listove i stabljike. Stabljika, iako se ne konzumira često, je izvor minerala i vlakana, fenolnih jedinjenja, a ima i dobru antioksidativnu aktivnost. Sastav nusproizvoda kupusa prema USDA bazi podataka je: 92.18% vlage, 0.1 % eterični ekstrakt, 1.28% proteina, 0.27% pepeo, 2.5% vlakna (Luz M. Alzate T., 2017; T.Bn. Brito, 2020).

U poslednjoj deceniji potrošnja brokolija (*Brassica oleracea* var. *silvestris*) se povećala nekoliko puta, zbog povećane informisanosti o visokom sadržaju polifenola, vitamina, minerala, antioksidanasa, antikancerogenih jedinjenja i vlakana. Od vitamina sadrži A, B6, B12, C, D, E, K, tiamin, riboflavin, niacin. Jedno je od najhranljivijih povrća a njegova svakodnevna konzumacija je preporučena od strane svetske zdravstvene organizacije (Geetha Shree Nagraj, 2020).

Karfiol i brokoli su najčešće korišćeno povrće u celom svetu. Prema izveštaju koji je izdala Organizacija za hranu i poljoprivredu (FAO) u 2015. godini, svetska proizvodnja karfiola i brokolija u 2013. bila je oko 22,2 miliona tona (Slika 3). Njihovi jestivi delovi su klice i cvetna glavica, dok veću količinu predstavlja nejestivi delovi, čak preko 70% biljke kao što su listovi, cvetovi i stabljike, koji se generišu tokom branja. Većina ovih nusproizvoda od karfiola i brokolija najviše zaostaju na zemljištu, dok se mala količina koristi za stočnu hranu i kao industrijsko đubrivo (Iniguez-Covarrubias i sar., 2001). Međutim, u nekoliko nedavnih studija, ove sirovine prepoznate su kao dobar izvor antioksidativnih jedinjenja, poput fenolnih jedinjenja (Huinh i sar., 2014; Llorach i sar., 2003), glukozinolata (Ares i sar., 2014; Cabello-Hurtado i sar.,



2012; Dominguez-Perles i sar., 2011), vlakana (Nilnakara i sar., 2009; Tanongkankit i sar., 2012) i aminokiselina (Arnaiz i sar., 2012).



Slika 3. Proizvodnja karfiola, brokolija i drugih Brassica vrsta u poslednje dve decenije

Kao i za ostalo voće i povrće, potrošnja kupusa i drugih *Brassica* vrsta bila je u stalnom porastu u poslednje dve decenije, u rasponu potrošnje od oko 45,3 miliona tona 1993. godine. na približno 71,4 miliona tona u 2013. (FAO, 2015) (Slika 3). Pošto se ovi proizvodi uglavnom konzumiraju sirovi i sveži, manje je proizvedenog otpada. Glavni otpad kupusa su listovi, koji nastaju iz procesa pakovanja i skladištenja, kao i kod kuvanja u domaćinstvu. Takođe povrće kao što je kineski kupus, beli i crveni kupus, prokelj, kelj, takođe su se pokazali kao potencijalni izvori bioaktivnih jedinjenja (Podsedeck, 2007).

Poznato je da su fenolna jedinjenja glavna antioksidativna jedinjenja *Brassica* povrća. Najzastupljenija grupa koja se nalazi u ovoj biljci su flavonoidi, koji uglavnom postoje kao

glikozidi kempferola i kvercetina kao i njihovih derivata u kombinaciji sa hidroksicimetnim kiselinama, npr. kafeinska, kumarinska, ferulna i sinapinska kiselina (Cartea i sar., 2010; Lin i sar 2010).

Okarakterisan je fenolni sastav 17 *Brassica* biljnih vrsta, pronalazeći 51 flavonoid glikozid gde su svi identifikovani kao glikozidi kempferola, kvercetina i izorhamnetina, tj. šesnaest neaciliranih flavonoidnih glikozida, i trideset pet aciliranih flavonoidnih glikozida Lin et al. (2010). Takođe studija o različitim vrstama *Brassica* (Collard Greens, Kale i Kineski brokoli), takođe je potvrdila da ima četrdeset pet flavonoida i trinaest derivata hidroksicimetne kiseline u ove tri biljne vrste (Lin i sar., 2009). Među njima, kempferol glikozidi su bila glavna jedinjenja, dok su kvercetin glikozidi identifikovani kao sporedne komponente.

Fenolni profil može biti prilično različit u zavisnosti od sorte, vrste, pa čak i delova biljaka iste vrste, klimatskih uslova, vremenski period branja i procesa nakon branja (Cartea i sar., 2010; Vale i sar., 2015). Koncentracija fenolnih jedinjenja ocenjena je u sedam sorti italijanske brasika vrste, odnosno italijanskom kelj, brokoli, savoj i beli kupus, karfiol, zeleni karfiol i prokulice (Heimler i sar. 2006). Otkriveno je da jestive sorte brokolija i kelja pokazuju najveći sadržaj ukupnih i fenola i flavonoida.

Fenolna jedinjenja prisutna u biljkama mogu se klasifikovati u slobodna fenolna jedinjenja pronađena u vakuolama biljnih ćelija, i vezana fenolna jedinjenja povezana sa strukturnim komponentama ćelijskog zida (celuloza, hemiceluloza, lignin, pektin i protein) kroz nekoliko kovalentnih veza (Cerda i sar., 2013). Slobodna fenolna jedinjenja mogu se efikasno ekstrahovati konvencionalnim tehnikama, dok nekoliko procesa hidrolize su korišćeni za lakše oslobađanje vezanih fenola. Enzimski tretman i fermentacija su alternativni procesi za dobijanje ekstrakata fenola sa visokim kvalitetom i visokom aktivnosti, korišćenjem ekonomičnih i ekoloških tehnika.

### 3.2.1. Metode ekstrakcije za izolovanje visoko vrednih jedinjenja iz nusproizvoda agroindustrije

Izolovanje bilo kog visoko vrednog molekula iz otpada od useva je najveći i veoma važan korak u njihovom korišćenju. Odgovarajući proces izolovanja daje odlične prinose ciljanih molekula. Korišćenje bilo koje metode za izolovanje svih prisutnih molekula otpada se ne preporučuje jer

njihovo dalje prečišćavanje do ciljnog molekula iziskuje mnogo vremena, a istovremeno predstavlja skup proces.

Ekstrakcija, prečišćavanje i karakterizacija su tri bitna koraka za dobijanje ciljanih molekula iz otpada (Baiano, 2014; Khodami i sar., 2013). Vrsta otpada, vrsta rastvarača, pH, temperatura, pritisak i priprema uzorka su neki od parametara koji bitno utiču na proces izolovanja (Hernandez et al., 2009).

Jedinjenja iz otpada od useva mogu se ekstrahovati bilo konvencionalnom metodom ili nedavno razvijenim metodama (Nakthong i sar., 2017). Konvencionalne metode su takođe poznate i kao klasične metode jer se koriste dugi niz godina:

- Ekstrakcija rastvaračem je metoda koja koristi visoku temperaturu kroz Sokhlet ekstrakciju (Sokhlet, 1879) ili na sobnoj temperaturi, perkolacija/maceracija (Abu-bakar i Hakue, 2020). Za izolovanje eteričnih ulja, koristi se i hidrodestilacija (Azmir i sar., 2013). Brojni pregledni članci su objavljeni o izolovanju, prečišćavanju i karakterizaciji molekula iz bioloških izvora (Baiano, 2014; Khoddami i sar., 2013; Hernandez i sar., 2009; Sokhlet, 1879; Abubakar i Hake, 2020; Azmir i sar., 2013).

Metoda *Sokhlet* ekstrakcije predstavlja osnovu izolovanja bioaktivnih komponenti iz prirodnih izvora posebno iz biljaka ili njenih delova (Sokhlet, 1879). U početku je razvijen za ekstrakciju lipida, ali zbog svoje robusnosti, ova metoda je proširena i na druge vrste metabolita (Sagar i sar. 2018). U ovoj metodi kontinualna ekstrakcija se odvija kroz *Sokhlet* ekstraktor gde jedinjenja ekstrakata zaostaju u posudi za destilaciju.

Metode perkolacije i maceracije ne koriste proces zagrevanja. Kod perkolacije, primenjuje se filtriranje kroz porozni materijal gde filtrat poseduje bioaktivna jedinjenja. Prilikom maceracije, biljni materijal se potopi u odgovarajući rastvarač određeni vremenski period i dalje filtrira u cilju dobijanja rastvora jedinjenja (Sagar i sar., 2018; Abubakar i Hakue, 2020).

- Hidrodestilacija se uglavnom koristi za ekstrakciju ulja i koristi se pre dehidracije biljnih uzoraka (Sagari sar., 2018; Azmir i sar., 2013). Ovaj metod ekstrakcije koristi vodu ili paru ili u kombinaciju vode i pare. Mešavina vode i ulja se kondenzuje i dalje idu na separator gde se razdvajaju. Ovaj metod pokazuje ograničenje prema termolabilnim

komponentama (Silva i sar., 2005). Takođe metoda ima nedostatke kao što su niska čistoća, upotreba veće količine rastvarača duži vremenski period i mogućnost degradacije jedinjenja.

- Ekstrakcija uz pomoć mikrotalasa (MAE) koristi se za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja (Jain i sar., 2009). Ova metoda koristi mikrotalase za generisanje toplote. Isparavanje ćelijske vlage čini biološki matriks poroznim što omogućava bolji prodor rastvarača i pomaže u ekstrakciji jedinjenja. Usled visoke temperature zabeležene su i neke degradacije molekula. U nekim slučajevima, izvedeno je izolovanje uz pomoć mikrotalasa bez upotrebe rastvarača (Alupului i sar., 2012).
- Ekstrakcije uz pomoć enzima izvedene su ili hladnim presovanjem, ili upotrebom vode kao rastvarača (Latif i Anvar, 2009). Faktori kao što su vreme, količina rastvarača, veličina biljnog otpada, i drugo, igraju važnu ulogu u ovoj metodi ekstrakcije (Niranjan et al., 2004). Ova metoda se smatra ekološki prihvatljivom.
- Metoda ekstrakcije uz pomoć impulsnog električnog polja je korišćena za ekstrakciju biomolekula iz otpada useva razgradnjom strukture ćelijske membrane (Vorobiev i sar., 2006). Ovaj metod koristi električni naboj koji radi na dipolnoj prirodi molekula i primenjen je bilo kontinuirani ili serijski režim (Puertolas i sar., 2010). Korišćenje optimalnog električnog polja ne dozvoljava porast temperature i sprečava razgradnju jedinjenja (Lebovka i sar., 2002).

Pored fenolnih jedinjenja, nusproizvodi *Brassica* vrsta takođe predstavljaju potencijalni izvor visoko vrednih jedinjenja – proteina.

### 3.3. Proteini

Reč „protein“ definiše jedinjenja iz grupe složenih organskih jedinjenja, koja se u osnovi sastoje od kombinacije 20 različitih amino-kiselina povezanih peptidnim vezama. Sastav proteina čine: 50-55% ugljenik, 6-7% vodonik, 20-23% kiseonik, 12-19% azot i 0,2-3% sumpor (Damodaran, 2000). Široko su rasprostranjeni u biljnom i životinjskom svetu kao glavni sastojak protoplazme svih ćelija i neophodni su za život.

Proteini igraju osnovnu ulogu u održavanju života, ali i kao važne komponente hrane, kako biljnog tako i životinjskog porekla. Njihov sadržaj i osobine znatno variraju u različitim izvorima

hrane ljilja. Pored nutritivne uloge, kao izvori esencijalnih aminokiselina koje su ključne za ljudski rast i održavanje, proteini, takođe, imaju strukturnu ulogu, i to zahvaljujući dobrim funkcionalnim osobinama.

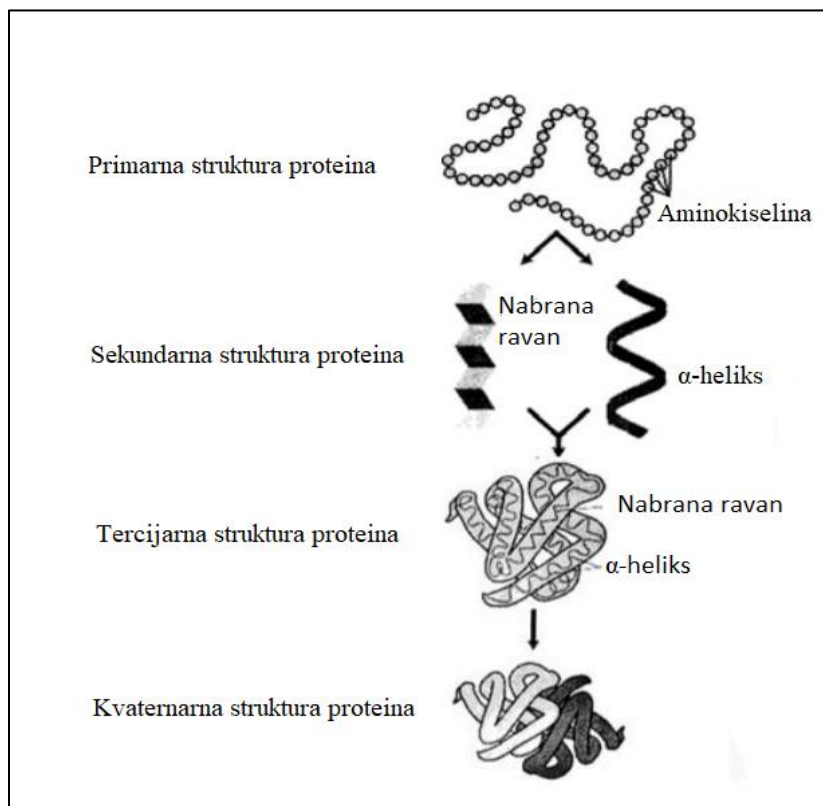
Na osnovu biološke funkcije proteini se mogu klasifikovati kao enzimski katalizatori, strukturni proteini, kontraktilni proteini (miozin, aktin, tubulin), hormoni (insulin), proteini nosači (hemoglobin, transferin), antitela (imunoglobulin), rezervni proteini (albumin, semenski proteini) i toksini (Coulter, 1984; Damodaran, 2000).

Četiri nivoa hijerarhijske organizacije koriste se za opisivanje strukture proteina (*Slika 4*):

1. Primarnu strukturu proteina čini redosled amino-kiselina povezanih peptidnom vezom, opisanih od N-kraja ka C-kraju. Primarna struktura takođe uključuje druge kovalentno vezane strukture, kao što je lokacija disulfidnih mostova i mesta post-translacionih modifikacija bočnih lanaca (npr. metilacija, glikozilacija, fosforilacija). Veličina lanca i redosled povezivanja aminokiselina određuje fizička, hemijska, strukturna, biološka i funkcionalna svojstva proteina.
2. Sekundarna struktura opisuje pravilne konformacije polipeptidnog kostura, koje su određene planarnošću peptidnih veza, vodoničnih veza između akceptora C-O i donora N-H grupa i moguće rotacije oko veza N-C<sub>α</sub> i C-C<sub>α</sub>. Najčešće zastupljene strukture jesu α-heliks i β-naborana strukture (Lesk, 2001). Pravilna geometrija periodičnih sekundarnih struktura omogućuje međusobno povezivanje sekundarnih strukturnih elemenata, koje takođe mogu dovesti do formiranja supersekundarnih struktura, uključujući zavojnice, trostruku zavojnicu, beta-alfa-beta motiv i dr. Trostruka spirala molekula kolagena i struktura zavojnica molekula miozina dobro su poznati primeri supersekundarnih struktura u proteinima hrane (Branden i Tooze, 1991).
3. Tercijarnu strukturu proteina čini opis celokupnog trodimenzionalnog savijanja peptidnog lanca. Ona uključuje način izvijanja polipeptidnog kostura (sekundarnu strukturu), raspored motiva u domene, kao i konformaciju bočnih lanaca ostataka amino-kiselina. U suštini, tercijarna struktura pruža informacije o kompletnom obrascu nabora primarne i sekundarne strukture proteinskog molekula, koje diktiraju njegovu konačnu veličinu i oblik. Pored toga, opisuje položaj svake amino-kiseline u

trodimenzionalnom prostoru, čime se obezbeđuju informacije o pristupačnosti ili stepenu izloženosti i potencijalu nekovalentnih interakcija bočnih lanaca.

4. Kvaternerna struktura se odnosi na četvorodimenzionalni nivo struktura proteinskih kompleksa koji mogu nastati udruživanjem identičnih ili različitih polipeptidnih lanaca.



*Slika 4. Osnovne strukture proteina*

Prema veličini i obliku, proteini se mogu podeliti u tri grupe (Koehl, 2006;):

- Fibrilarni proteini – izduženi, proteini kod kojih je dominantna sekundarna struktura. Budući da su nerastvorljivi u vodi, uglavnom imaju potopornu ili strukturnu ulogu u organizmu. Neki od predstavnika ove grupe jesu kolagen i keratin.
- Membranski proteini – proteini koji se nalaze u ćelijskim membranama i membranama nekih organela.
- Globularni proteini – sačinjeni su od više sekvenci koje se ne ponavljaju. Ostaci nepolarnih aminokiselina globularnih proteina ispoljavaju tendenciju da se nagomilavaju

u unutrašnjosti proteina čineći hidrofobno jezgro, dok hidrofilni aminokiselinski ostaci ostaju orijentisani prema rastvaraču na spoljašnjoj stani „globule“.

### **3.3.1. Alternativni izvori proteina**

Pored izvora proteina životinjskog porekla (oko 20%) koji se koriste u ljudskoj ishrani, primenjuju se i biljni izvori proteina (80%) (Belitz i sar., 2009). Svaki od ova dva izvora proteina karakteriše osoben aminokiselinski sastav kao i odgovarajuća nutritivna vrednost.

Prema poslednjim podacima svetska potražnja za proteinima životinjskog porekla je u konstantnom porastu, i očekuje se da će biti udvostručena do 2050 (FAO, 2015). Međutim, opšte je poznato da proizvodnja proteina životinjskog porekla, mesa i mesnih preradjevina može da ima negativan uticaj na životnu sredinu, kao i na ljudsko zdravlje a tiče se prekomerne konzumacije mesa i mesnih preradjevina. U skladu sa tim sve veće interesovanje je usmereno na alternativne izvore proteina.

Generalno, alternativni izvori proteina mogu se podeliti u nekoliko kategorija:

- Biljni proteini iz semena mahunarki, žitarica, uljarica i nusproizvoda njihove prerade
- Proteini iz mikroalgi i zelenog lišća (zeleni biomasa)
- Proteini iz insekata

#### **3.3.1.1. Biljni izvori proteina**

Prelazak na održivu proizvodnju hrane podrazumeva manje oslanjanja na proteine životinjskog porekla, podstičući poljoprivredno-prehrambene industrije da traže nove i alternativne izvore proteina. Alternative mlečnim i mesnim proizvodima na bazi biljnih proteina mogu pružiti jednake količina uz znatno niže troškove uz smanjenje uništavanja šuma i emisije gasova sa efektom staklene bašte. Duboko razumevanje funkcionalnih i fizičko-hemijskih osobina biljnih proteina i njihovih derivata su suštinski neophodni radi njihove upotrebe u poboljšanju

formulacija prehrambenih proizvoda (Conde, del Mar Iust Escobar, Pedroche Jiménez, Rodriguez, & Rodriguez Patino, 2005; Sa Moreno, & Carciofi, 2020). Pored toga, upotreba ovih novih izvora proteina na biljnoj bazi zahteva razvoj novih lanaca vrednosti, sa velikom pažnjom na varijable kao što su prihvatanje potrošača, skalabilnost, bezbednost hrane i troškovi proizvodnje.

Biljni proteini odlikuju se visokom nutritivnom vrednošću, koja se definiše aminokiselinskim sastavom i udelom esencijalnih aminokiselina u dozi koju preporučuje Svetska zdravstvena organizacija. Takođe, biljni proteini, zbog svojih specifičnih fizičko hemijskih osobina, predstavljaju dobre funkcionalne komponente koje utiču na određene karakteristike proizvoda kao što su tekstura, konzistencija, organoleptičke karakteristike i dr. Takođe, ispoljavaju i određene biološke aktivnosti, zbog čega imaju potencijal za primenu u proizvodima farmaceutske i kozmetičke industrije, kao i u proizvodnji funkcionalne hrane (Clemente, 2000; Zhu i sar., 2006; Yoshie-Stark i sar., 2008).

Posle soje, najviše eksploatisane biljne vrste za proizvodnju različitih komercijalnih proteinskih proizvoda, poslednjih godina sve veća pažnja usmerena je ka proteinima poreklom iz drugih mahunarki, semena uljarica, žitarica i nusprodukata njihove prerade (Moure i sar., 2006). Razne vrste pasulja (El-Adawy, 2000) i graška (Heng, 2005), zatim, suncokret (GonzálezPérez i Vereijken, 2007), uljana repica (Chabanon i sar., 2007), semena biljaka familije Cucurbitaceae (uljane tikve, lubenice) (Peričin i sar., 2005), ali i mnoge žitarice, predstavljaju značajne izvore proteina.

#### 3.3.1.1.1. Klasifikacija biljnih proteina

Biljni proteini se, najšire gledano, mogu podeliti u dve kategorije:

- metabolički aktivni tzv. „housekeeping“ proteini, koji su zaduženi za održavanje normalnog ćelijskog metabolizma i
- rezervni proteini (Millerd, 1975).

Prema kasnijoj klasifikaciji, dele se na rezervne, strukturne i biološki aktivne (Fukushima, 1991), među kojima su glavni enzimski inhibitori. Inhibitori proteaza prisutni su najčešće u



leguminozama, dok žitarice, osim inhibitora proteaza, sadrže i inhibitore  $\beta$ -amilaze. Rezervni biljni proteini, s druge strane, korisni su jedino kao izvori azota i sumpora tokom procesa klijanja i razvoja biljke. Najzastupljeniji su u semenu, te stoga imaju najveći uticaj na nutritivne osobine, kao i mogućnost procesiranja same biljke. Proteini koji se svrstavaju u rezervne jesu oni koji se akumuliraju u semenu u velikim količinama, hidrolizuju na sastavne amino-kiseline tokom procesa klijanja i koji poseduju visok nivo aminokiselina bogatih azotom (Lambert i Yarwood, 1992).

Na osnovu rastvorljivosti, biljni proteini klasifikovani su prema Osbornu (1914) na sledeće kategorije:

- Albumini: rastvorljivi u vodi;
- Globulini: rastvorljivi u rastvorima soli određene jonske jačine;
- Prolamini: rastvorljivi u alkoholu;
- Glutelini: najteže rastvorljivi; rastvaraju se u kiselim ili baznim rastvorima ili u prisustvu SDS.

Albumini i globulini čine glavne proteine dikotiledonih biljaka (mahunarke i uljarice), dok su prolamini i glutelini glavni proteini monokotiledonih (žitarice) (Mandal i Mandal, 2000).

### **3.4. Proteini iz nusproizvoda**

Nusproizvodi koji potiču od mahunarki, žitarica, i uljarica su jeftini i neiskorišćeni izvori koji su sa ekološko – ekonomskog aspekta izuzetno pogodna sirovina za dobijanje visoko vrednih jedinjenja. Prepoznati su kao sirovina za ekstrakciju proteina, ugljenih hidrata, lipida i drugih bioaktivnih jedinjenja (dijetalna vlakna, fenolna jedinjenja, alkaloidi i pigmenti) u ljudskoj ishrani (Dapčević Hadnađev i sar., 2018).

Najbogatiji izvori za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja i proteina u prvom redu su semena uljarica poput semena soje, suncokreta, susama, uljane tikve golice i uljane repice. Ekstrakcijom ulja iz semena (hladno presovanje ili hemijski pomoću rastvarača) kao glavni nusproizvod industrije ulja zaostaje uljana pogača i/ili sačma, koja po hemijskom sastavu sadrži visok sadržaj proteina (15 - 60%) antioksidanasa, vlakana, vitamina i minerala, koja može da se koristi dalje u različitim formulacijama kao nutritivno bogat dodatak ljudskoj ishrani. Sadržaj proteina u sačmi

uljarica zavisi od mnogo faktora a pre svega od vrste uljane kulture, od načina i uslova gajenja, od tretmana koji prethode ekstrakciji ulja (Ramachandran i sar., 2007), stepena ekstrakcije ulja iz početne sirovine, u zavisnosti od toga da li zrno uljarice tokom prerade sadrži ljusku ili ne, kao i od samog načina prerade zrna - tačnije metode dobijanja ulja. Uljane pogače koje zaostaju nakon mehaničkog presovanja sadrže visok procenat ulja (više od 5%) pa je potrebno obratiti pažnju kod skladištenja ovakve sirovine, jer je zbog toga podložna kvarenju, a pored toga mogu sadržati i antinutrijente, teške metale i toksine, koje je neophodno eliminisati pre njihove upotrebe u različitim formulacijama.

Nusproizvodi prerade žitarica, kao što su pirinčane mekinje, ovsene mekinje (Guan i Iao, 2008), pšenične mekinje, pšenične klice nakon ekstrakcije ulja (Zhu i sar., 2006) predstavljaju dobar izvor za dobijanje proteina. Pirinčane mekinje pokazale su se kao najbolji izvor jer proteini pirinča poseduju visoku hranljivu vrednostu, sa dobro izbalansiranim aminokiselinskim sastavom, a sa druge strane nisu alergeni i poseduju niz bioaktivnih osobina (Amagliani i sar., 2017). Pšenične mekinje sadrže 13-18% proteina, koji su, iako visokokvalitetni, čvrsto vezani u polisaharidnu matricu, što otežava njihovu svarljivosti, mogu da se koristiti za proizvodnju slobodnih aminokiselina i bioaktivnih peptida (Balandran-Kuintana i sar., 2015). Pšenične klice preostale nakon ekstrakcije ulja sadrže više od 30% proteina dobro izbalansiranog aminokiselinskog sastava sa visokim sadržajem esencijalnih amino-kiselina kao što su lizin, metionin i treonin, a mogu se koristiti za izolaciju bioaktivnog peptida (Ge i sar., 2000).

Mahunarke predstavljaju još jedan, vredan izvor proteina i esencijalnih aminokiselina. Nakon dobijanja ulja iz soje, zaostaju obezmaščene ljuspice koje su izvor sa visokim sadržajem proteina (40% - 90%) a koriste se za dobijanje proteinskog brašna i griza, proteinskih koncentrata i izolata, i kao dodatak pekarskim proizvodima, mesu, mesnim prerađevinama i u industriji mleka (Singh i sar., 2008).

Od značajnih nusproizvoda prerade povrća može se izvojiti trop od paradajza (19% - 22% sirovih proteina), koji se dobija nakon ceđenja soka i sadrži mešavinu semena, ljuske i pulpe. Seme paradajza pokazalo se kao dobar izvor proteina (25%), u kom su zastupljene sve aminokiseline sa sadržajem iznad preporučenog od strane WHO/FAO/UN (Svetska zdravstvena organizacija, 2007)(Sarkar i Kaul, 2014).

### 3.5. Proteini iz zelenog lišća kao nusproizvoda agroindustrije

Kao što je već napomenuto, alternativni izvori proteina su u posljednje vreme atraktivan predmet istraživanja, kako bi se osigurala buduća potreba za hranom i proteinima. Među ovim izvorima, zelena biomasa dobija sve veću pažnju kao izvor proteina. Međutim, poređenjem prinosa i čistoće proteina ekstrahovanih iz ovih izvora sa odgovarajućim podacima iz proteinskih izvora kao što su soja, lupina i mahunarke, zabeleženi su mnogo niži prinosi za alternativne biomase.ref nova

U nove, alternativne izvore proteina spadaju biljna i vodena biomasa, zajedno sa insektima, pojedinačnim ćelijama i otpadom, tačnije sa sporednim tokovima (nusproizvodima) iz nekoliko industrija. Zelena biljna biomasa obuhvata travu, lucerku, i lišće agroindustrijskih useva (npr. lišće šećerne repe, manioke, karfiola, duvana, brokolija, karfiola itd.) i drveće (npr. *Moringa Oleifera*, maslina), dok vodenu biomasu čine mikro i makro alge i vodene biljke poput *Duckweed* (vrsta paprati).

Biljne i vodene biomase se istražuju kao izvori hrane zbog visokog sadržaja proteina i/ili njihove velike dostupnosti. Dalje prednosti ovih biomasa su njihov prinos proteina po hektaru, i njihova veća efikasnost konverzije proteina. Prednosti, posebno za vodenu biomasu je to što nemaju nikakvu konkurenciju za obradivu zemlju i vodu, kao i njihove visoke stope rasta (Leng, Stambolie, & Bell, 1995; van Krimpen, Biker, van der Meer, van der Pit-Švering I Vereijken, 2013).

Zelena vegetacija može predstavljati obnovljivi izvor hrane u svetu. Ekstrakt lista sadrži proteine, šećere, soli, lipide i vitamine zajedno sa vlagom iz biljke. Tokom poslednjih 50 godina razvijene su brojne tehnologije za odvajanje proteina od pratećeg vlaknastog materijala iz lišća.

Nemoguće je precizno datirati početak ove linije istraživanja. Većina radova na frakcionisanju zelenih useva preduzeta je sa ciljem ekstrakcije proteina iz zelenih listova za upotrebu u ishrani ljudi. Sistematske studije o zelenoj vegetaciji kao izvoru proteinske ishrane počela je još 1920. godine (Ozborn, 1924). Nakon toga nekoliko radova postoji na temu dizajna i testiranja opreme, za upotrebu u ekstrakciji proteina iz zelenih listova. Zagrevanje soka oslobođenog tokom frakcionisanja široko se preporučuje za pripremu koncentrata proteina lista. Pirie (1971) i Pirie (1978) razvili su različite tipove sistema u kojima se izvodi koagulacija zagrevanjem. Tokom

1940. godine, primenom različitih milnova (čekićara, vijčanih, kugličnih, sa šipkama) pokušali su da izoluju proteine iz zelenog lišća (Pirie, 1987).

Američki koncept frakcionisanja zelenih useva ali uopšte i proizvodnje proteina lišća posebno je drugačiji. Koncept se zasniva na tome da samo višak proteina iz lišća treba da se ekstrahuje, ostavljajući za sobom ostatak za proizvodnju delimično dehidrirane stočne hrane visokog kvaliteta sa niskom vlagom i umerenim sadržajem proteina. U tu svrhu predlažu upotrebu rol prese za maceraciju zelenog otpada sa useva i ekstrakciju soka iz njih (Knuckles i sar., 1970).

Na osnovu dosadašnjih saznanja o proteinima lišća zaključuje se da je nutritivna vrednost ovih proteina uporediva sa izolatima proteina životinjskog porekla i čak superiornija ili slična onim proteinima iz semena (Morris, 1977). Vlaknasti presovani ostatak, koji zaostaje nakon ekstrakcije proteina lišća pogodan je kao stočna hrana (Connell i Houseman, 1977). Frakcionisanje zelenih useva na farmama i može se odvijati u ruralnim oblastima bez narušavanja preovlađujućih poljoprivredne prakse (Joshi et al., 1983).

Proučavano je nekoliko biljnih vrsta za ekstrakciju proteina iz lišća, uključujući lucerku (Lamsal, Koegel, & Boetcher, 2003; Wang i Kinsela, 1976), spanać (Barbeau & Kinsella, 1988), duvan (Fu et al., 2010), lišća- manioke (Coldebella i sar., 2013), *Moringa oleifera* (Teikeira, Carvalho, Neves, Silva, & Arantes-Pereira, 2014) soje (Betschart & Kinsella, 1973) među mnogim lokalnim usevima u različitim zemljama.

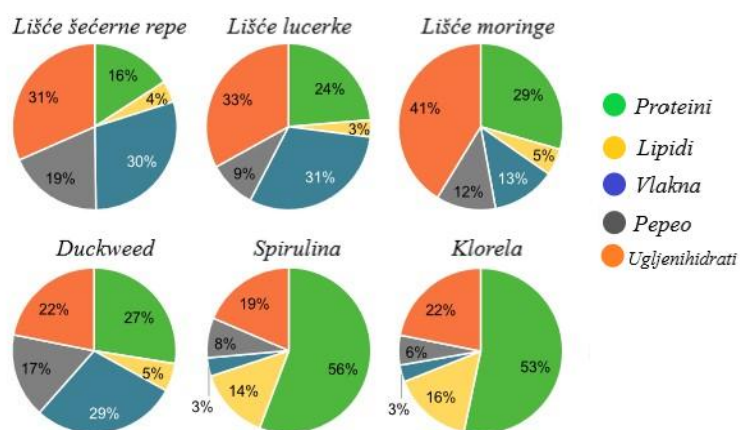
Takođe, Wang i sar, (2013) su opisali su nusproizvode karfiola kao izvora proteina lišća, a Yang Xu i sar, (2017) istražuju upotrebu ultrazvuka kao predtretmana u postupku ekstrakcije proteina lišća karfiola i pokazuju da hidrolizati ovih proteinskih izolata imaju antioksidativno dejstvo i podstiču potrošnju glukoze. Metode ekstrakcije lišća koje su korišćene uglavnom su se fokusirale na ekstrakciju rastvorljivih proteina gde više od polovine svih proteina ostaje neekstrahovano. Ukupnu ekstrakciju proteina iz listova šećerne repe opisali su Angelica Tamaio Tenorio i sar. (2016). Slično, Chen Zhang i saradnici (2014) su dokazali da se visok prinos proteina može dobiti alkalnom ekstrakcijom iz listova na ekonomičan način, pri čemu su temperatura, količina alkalija i vreme ekstrakcije bili presudni za visoke prinose ekstrakcije. Fizičko-hemijska svojstva, kao što su distribucija molekulske mase, temperatura denaturacije i funkcionalna

svojstva kao što su emulgovanje, formiranje i rastvorljivost rastvorljivih proteina lista iz trave lucerke, opisali su B.P. Lamsal i sar. (2007).

### 3.5.1. Osobine zelenog lišća

Kao što je već istaknuto, biljni listovi su prepoznati kao potencijalni izvor proteina za primenu u ishrani a što je zasnovano na njihovom nutritivnom profilu i njihovoj velikoj dostupnosti u tokovima poljoprivrednog otpada. Za većinu industrijalizovanih useva, samo se specifični delovi biljaka (npr. koren, cveće i plodovi) ubiraju i prerađuju, dok se listovi, koji čine tone biomase godišnje, ostaju neiskorišćeni.

Sadržaj proteina u lišću kreće se između 16 i 29% suve materije (Slika 5) a varijacije zavise od useva, starosti biljke, kao i uslova uzgajanja i uslova spoljašnje sredine. Osim proteina, biomase su bogate dijetalnim vlaknima, antioksidantima, vitaminima, mineralima, pigmentima koji su pogodni kao boje i druga bioaktivna jedinjenja što može povećati njihovu vrednost. Bogat i promenljiv sastav biljne biomase dovodi do različitih načina za valorizaciju tokom obrade.



Slika 5. Prosečan sastav suve materije biljne biomase: lišća šećerne repe (Tamaio Tenorio i sar., 2016), lišća lucerke (Digman, Runge, Shinnars, & Hatfield, 2013) i lišća Moringa Oleifera (Gopalakrišnan, Dorija i Kumar, 2016); vodene biomase: Duckweed (Appenroth i sar., 2017), mikroalge Chlorella (Tibbetts, Millei, & Lall, 2015) i Spirulina (Tibbetts i sar., 2015; USDA, 2016a)

Pored proteina, listovi sadrže obilje ugljenih hidrata i dijetetskih vlakna (Slika 5). Vlakna lista, koja se uglavnom odbacuju nakon inicijalne obrade lišća, zapravo su mnogo zastupljenija od

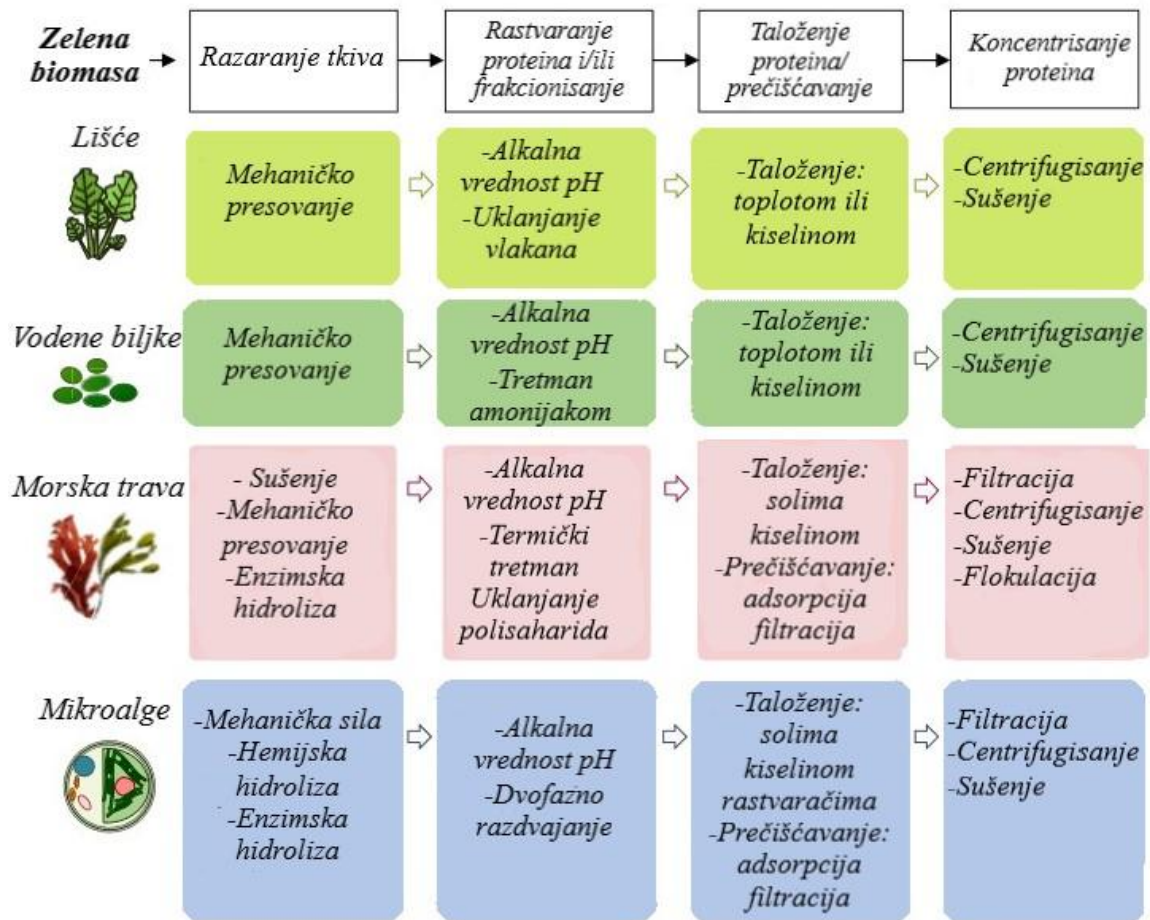
proteina. Vlakna se obično koriste za stočnu hranu, silažu i biogoriva. Ovakve nisko-vredne primene biraju se upravo zbog njihovog visokog sadržaja celuloze i hemiceluloze koji imaju nisku svarljivost (Bals i sar., 2012). Međutim, u literaturi su opisane i bolje upotrebe ovakve sirovine za dobijanje proizvoda celulozom sa tehno-funkcionalnim svojstvima kao sastojcima hrane (Tamaio Tenorio, Gieteling, Nikiforidis, Boom i van der Goot, 2017c).

### **3.5.1.1. Metode ekstrakcije proteina**

Proteinski proizvodi mogu biti kategorisani na osnovu sadržaja proteina kao proteinsko brašno (sadrži do 65% proteina), proteinski koncentрати (sadrže od 65-90% proteina) i izolati (sadrže više od 90% proteina) (Oreopoulou i Tzia, 2007).

Ekstrakcija proteina iz zelene biomase fokusira se na rastvorljivu proteinsku frakciju, koja u listovima uglavnom sadrži enzim ribulozu 1,5-bisfosfat karboksilazu/oksigenazu (rubisco) (Barbeau & Kinsella, 1988). Dostupne su različite tehnologije za degradaciju i razlaganje ćelijskih zidova kako bi se oslobodio rastvorljivi materijal, nakon čega sledi dalje frakcionisanje u cilju izolovanja specifičnih proteina.

Slika 6. predstavlja tipične korake ekstrakcije proteina iz zelene biomase, dajući pregled metoda po grupi biomase. Metode se kreću od jednostavnog ručnog mlevenja do ekstrakcije potpomognute jonskim tečnostima ili enzimskim predtretmanima u zavisnosti od tipa biomase. Listovi predstavljaju veliki izazov za prečišćavanje proteina zbog koekstrakcije drugog ćelijskog sadržaja, kao i za uklanjanje polisaharida i fenola koji stupaju u interakciju sa proteinima.



Slika 6. Proces ekstrakcije proteina iz zelene biomase (gornja linija) i pregled metoda ekstrakcije za svaku grupu biomase

Nakon razaranja strukture ćelijskog zida, proteini i drugi ćelijski sastojci su dostupni za dalju obradu. Ekstrakcija proteina se obično vrši solubilizacijom proteina u alkalnim rastvorima (alkalna ekstrakcija proteina), nakon čega se protein sakuplja putem izoelektrične precipitacije (pH 3–5). Alkalna ekstrakcija je konvencionalna metoda koja se najčešće koristi za ekstrakciju i izolovanje proteina. Alternativno, metode frakcionisanja uključuju precipitaciju sa rastvaračima, adsorpciju i (ultra)filtraciju (Safi i sar., 2014c). Slično, proteini iz lišća se ekstrahuju nakon mehaničke destrukcije (npr. mlevenjem) u cilju oslobađanja rastvorljivih komponenti, što je dalje praćeno izoelektričnim taloženjem (pH 4), hladnim taloženjem (4°C) ili termičkom koagulacijom (60–95 °C), takođe i kombinacijom pH- i termičke obrade. Dobijeni ekstrakt se u konačnoj fazi koncentriše i/ili suši (Coldebella i sar., 2013).

Ekstrahovani rastvorljivi proteini čine oko polovine proteina lista, dok se preostala polovina odbacuje kao zelena nerastvorljiva masa, koja se sastoji od ćelijskih ostataka, razrušene hloroplasti i pigmenata (Tamaio Tenorio, Gieteling, de Jong, Boom i van der Goot, 2016). Finalni prinos proteina u koncentratima proteina lista je tipično 40–60% od ukupnih proteina lista, u zavisnosti od biljnog izvora i procesa ekstrakcije (Bals i sar., 2012; Chiesa i Gnansounou, 2011).

U literaturi postoje radovi koji pokazuju da su veći prinosi proteina ostvareni primenom alkalnog rastvaranja pre taloženja i koncentrisanja proteina (Zhang, Sanders i Bruins, 2014). Ovaj tretman omogućava ekstrakciju proteina od svežeg i osušenog lišća, jer se degradacija ćelijskog zida dešava istovremeno sa rastvaranjem proteina (Sari, Bruins, & Sanders, 2013).

Pronosi ekstrakcije proteina se mogu povećati sa enzimskim predtretmanima. U te svrhe mogu se koristiti mešavine enzima koji učestvuju u razgradnji ćelijskog zida ćelijskog zida, dok se enzimi koji razgrađuju ugljene hidrate mogu koristiti za smanjenje sposobnosti zadržavanja vode nerastvornog materijala. Ovakav enzimski tretman omogućava dalje oslobađanje proteina usled razlaganja strukturnih jedinjenja ćelijskog zida i bolje odvajanja rastvorljivih frakcija koja sadrži protein, o čemu će više biti rečeno u narednom poglavlju. Izolovanje ovih rastvorljivih frakcija se poboljšava snažnim centrifugiranjem ili upotrebom flokulanata, što rezultira neto povećanjem ukupnog prinosa.

Mogućnosti primene dobijenih proteinskih ekstrakata u prehrambenim proizvodima je pod uticajem uslova obrade, jer do denaturacije proteina ili hidrolize može da dođe i pri visokim alkalnim pH vrednostima ili visokim temperaturama. Neto efekat na funkcionalnost se zatim utvrđuje konačnom aplikacijom. Veliki proteini (nehidrolizovani ili delimično hidrolizovani) su poželjni za želiranje i teksturne funkcije (Hettiarachchi, Kannan, Schafer i Vagner, 2013) dok su manji delimično hidrolizovani proteini pogodni kao emulgatori (Lam i Nickerson, 2013).

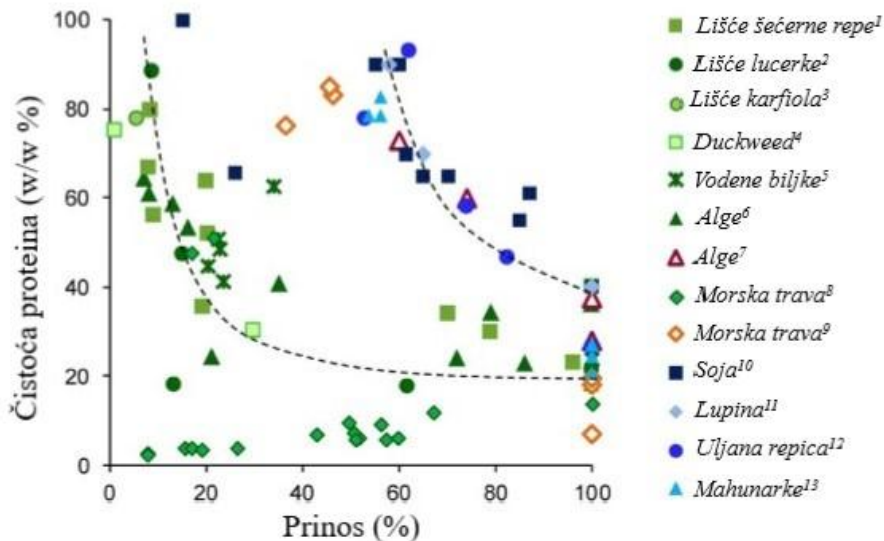
Pri analizi novih izvora proteina, od značaja je i njihovo poređenje sa tradicionalnim izvorima biljnih proteina, kao što su žitarice i mahunarke. Za ovo poređenje, na Slici 3 prikazani su podaci o čistoći ekstrahovanih proteina iz različitih izvora u funkciji njihovog prinosa ekstrakcije. Protein soje se smatra vrhunskim proizvodom, s obzirom na njegovu masivnu proizvodnju i aplikaciju. Lupin, repica i neke mahunarke su relativno novi izvori proteina sa sličnim



performansama u frakcionisanju kao soja. Ove proteinske kulture prate sličan trend i uspostavljaju ciljeve prerade od 50 – 60% prinosa sa čistoćom proteina od ~70% za koncentrate i ~90% za izolate.

Drugačiji trend se zapaža kada se razmatraju proteinski prinos i čistoća za zelenu biomasu, odnosno zeleno lišće. Zelenu i vodenu biomasu prati međusobno sličan trend, koji je okarakterisan ekstraktima bogatim proteinima (60–80% proteina), uz mnogo manji prinos (10%). Neto efekat niskog prinosa proteina iz zelene biomase može biti razlog zašto procesi ekstrakcije nisu široko prihvaćeni.

Moguća tumačenja razlika između zelenog lišća (zelene biomase) i tradicionalnih proteinskih useva oslanjaju se na tehnologije koje se primenjuju za ekstrakciju i vrstu biljnog tkiva koje se koristi: seme naspram fotosintetičkog aktivnog tkiva. Čini se da tehnologije koje se koriste za razdvajanje proteina kod tradicionalnih izvora proteina nisu optimalne za lišće i druge zelene biljne vrste. Dakle, kada nova tehnologija dovede do tačke iznad trenutne krive čistoća proteina - prinos, može se smatrati tehnološkim prodorom (Slika 7)(Tamayo Tenorio i sar., 2018).



Slika 7. Prinos ekstrahovanog proteina kao funkcija čistoće proteina čistoća (w/w%, na suhu materiju) (g proteina u proizvodu po gramu proteina u sirovini) (Kiskini, Visers, Vincken, Gruppen, & Vierenga, 2016;)<sup>1</sup>, (Edwards i sar., 1975)<sup>2</sup>, (Ksu i sar., 2016)<sup>3</sup>, (van Krimpen i sar., 2013)<sup>4</sup>, (Devanji, 1993)<sup>5</sup>, (Kavonijus, Albers i Undeland, 2015;)<sup>6</sup>, (Sari i sar., 2013)<sup>7</sup>, (Angell i

*sar., 2017;*)<sup>8</sup>, (*Wong i Cheung, 2001*)<sup>9</sup>, (*Campbell i Glatz, 2010*)<sup>10</sup>, (*Berghout, Pelgrom, Schutiser, Boom, & van der Goot, 2015*)<sup>11</sup>, (*Dijkstra i sar., 2003*)<sup>12</sup>, (*Boie i sar., 2010*)<sup>13</sup>

U slučaju da tačke ostanu na pravo, može se zaključiti da je razlika između biljnih vrsta u vezi sa prirodom biomaterijala. U takvom kontekstu, niski prinosi dobijenih kod zelenih biomasa su posledica nedostatka anatomije skladištenja proteina u ovim kulturama, čak i kada je početni sadržaj proteina u suvoj materiji visok (npr. 40–50% alge) što je uporedivo sa sadržajem proteina kod soje. Dakle, kriva zelene biomase će ostati u niskom opsegu ako visok sadržaj proteina ide zajedno sa niskom dostupnosti proteina. Tada se predviđa tehnološki prodor, kao efikasan proces koji će povećati sadržaj proteina cepanjem veza između protein - pigment, protein - polisaharid i protein – polifenol kompleksa.

Još jedna biohemijska razlika koja dovodi do izazova u ekstrakciji proteina iz zelenog lišća je prisustvo fenolnih jedinjenja. Prirodna fenolna jedinjenja reaguju sa aktivnim grupama u proteinskim molekulima, posebno pod oksidativnim stresom, menjajući fizičko-hemijske osobine proteina kao što su rastvorljivost, termička stabilnost, struktura i svarljivost.

Prilikom ekstrakcije proteinskog izolata iz lišća, prinos proteina je nizak uglavnom zbog velikih gubitaka proteina tokom procesa, takođe u obliku zelene nerastvorljive mase koja sadrži nerastvorljive protein lišća (npr. membranski proteini). Sa ovim tokom otpada, oko 50% od ukupnog proteina se odbacuje (Barbeau i Kinsella, 1988). Dodavanje ispiranja kao još jednog koraka omogućava dodatno izdvajanje samo oko 12% proteina (Tamayo Tenorio i sar., 2016).

Proteini u nerastvorljivoj masi mogu se prečistiti metodama koje uključuju niz koraka ekstrakcije sa rastvaračima (npr. hloroform, metanol) i hemijske reagense (npr. trihlorosirćetna kiselina) koji se mogu primeniti u prehrambenoj industriji u određenoj meri. Kombinacija rastvarača je neophodna za stvaranje širokog spektra uslova ekstrakcije (npr. polaritet, rastvorljivost) i za proteine koji su čvrsto vezani za membranu. Zbog heterogenosti membranskih proteina lišća postoji potreba za različitim uslovima ekstrakcije onemogućava izolovanje velike frakcije proteina u jednom koraku. Dakle, svi koraci zajedno omogućavaju prečišćavanje specifičnih proteina ili grupe proteina, ali rezultiraju niskim prinosom proteina (Tamayo Tenorio, Boom, i van der Goot, 2017a).

Potrebno je napomenuti i da nizak sadržaj suve materije u zelenoj biomasi takođe znači rukovanje velikom količinom vode i podrazumeva transport velike količine biomase. Štaviše, visok sadržaj vlage u zelenoj biomasi čini ga sklonim kvarenju usled brzog enzimskog i mikrobnog razlaganja (Kames, Bals, Dale i Allen, 2011). Opcije za izbegavanje kvarenja su stabilizacijski tretmani koji imaju za cilj uklanjanje vode (npr. sušenje) ili zaustavljanje enzimskih reakcija (npr. zamrzavanje, hemijski tretman). Tako, početno rukovanje (npr. branje, skladištenje) i stabilizacija biomase tokom obrade velikih razmera su podjednako važni kao i ekstrakcija procesi za dobijanje proizvoda visoke dodatne vrednosti (npr. proteini, bioaktivni jedinjenja). Ova dodatna obrada može na kraju da odredi održivost i izvodljivost procesa.

Ukratko, može se naglasiti da dostupne tehnologije za preradu zelenog lišća zahtevaju dalji razvoj radi prevazilaženja postojećih nedostataka: niski prinosi proteina, visoki troškovi energije, teška implementacija velikih razmera i neizvesnu održivu prednost. Radi rešavanja ove vrste izazova, potrebno je bolje razumevanje sastava i interakcija koje se javljaju u zelenim izvorima tako da odatle proizilaze pokretačke sile potrebne za razdvajanje sastojaka.

### **3.6. Predtretmani u izolovanju proteina**

Konvencionalne tehnike ekstrakcije biomolekula imaju ograničenja u pogledu niskog prinosa ekstrakcije, vremenske neefikasnosti i lošijeg kvaliteta ekstrakta zbog ostataka organskih rastvarača prisutnih u njima. Takođe, prisustvo polisaharida kao što su hemiceluloza, škrob i pektin unutar ćelijskog zida, smanjuje efikasnost ekstrakcije konvencionalnih tehnika ekstrakcije. Dakle, postoji potreba za zelenim i novim metodama ekstrakcije radi poboljšanja prinosa biomolekula.

Predtretmani koji se koriste uglavnom u vodenim postupcima izolovanja proteina, imaju za cilj dezintegraciju ćelijskog zida i, shodno tome, olakšano izdvajanje proteina. Najefikasnijim su se pokazali enzimski predtretmani. Pored enzima, sve veću primenu imaju mikrotalasi i ultrazvuk, koji se najčešće koriste u prehrambenoj industriji, zatim delovanje pulsno električnog polja, visokog pritiska i superkritičnih fluida (Pojić i sar., 2018). Primena svih ovih predtretmana pokazuje uticaj i na funkcionalnost dobijenih proteina. U većini slučajeva zapažene su unapređene osobine rastvorljivosti, formiranja pene ili emulgovanja (Ochoa-Rivas i sar., 2017).

### 3.6.1. Primena ultrazvuka kao predtretmana u izolovanju proteina

Ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka je jedna od atraktivnih metoda za ekstrakciju biljnih bioaktivnih jedinjenja. Prihvaćena je kao tehnika zelene ekstrakcije zbog svojih visokih performansi uz trošenje manje rastvarača i manje potrošnje vremena, kao i činjenice da je pogodna za termolabilna jedinjenja (Fu i sar., 2021). Takođe, ultrazvučna tehnika se obično koristi u prehrambenoj industriji jer predstavlja efikasan metod za ubrzavanje hemijske reakcije kavitacijom (Cui i sar., 2021). Ultrazvučni talas može izazvati promenu u unutrašnjoj strukturi matriksa biljnog matriksa (Rahaman et al., 2019), a samim tim olakšava oslobađanje bioaktivnih jedinjenja nakon destrukcije ćelije (Hadidi i sar., 2020).

#### Mehanizam ekstrakcije uz pomoć ultrazvuka

Ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka koristi energiju ultrazvuka za stvaranje kavitacionih mehurića koji proizvode mehaničke i toplotne efekte na biljne ćelije. Dezintegracija ćelijskog zida oslobađa bioaktivna jedinjenja u medijum rastvarača putem difuzije i/ili rastvaranjem (Bi i sar., 2019). Dakle, bioaktivna jedinjenja se ekstrahuju iz biljnih ćelija u prisustvu gradijenta prenosa mase. Pri ekstrakciji bioaktivnih jedinjenja iz biljnih izvora obično se koristi ultrazvuk sa frekvencijom iznad 20 kHz.

Ultrazvučna tehnologija jedna je od pouzdanih tehnika za poboljšanje disperzibilnosti proteina, posebno tokom inkorporacije biljnih proteina u formulaciju hrane (Omura i sar., 2021).

Prema Celotti et al. (2021), kratko vreme ultrazvučnog tretmana (5 min) može da dovede do promene proteinske strukture u nepravilne fragmente. Izlaganje proteina duže vreme (10 min) pri velikoj ultrazvučnoj snazi (amplituda > 30%) stvorilo bi manju veličinu čestica. Ultrazvuk takođe može da dovede do poboljšanja toplotne stabilnosti proteina. Ovaj efekat može biti posledica sila smicanja koje se stvaraju tokom kavitacije a mogu poremetiti hidrofobne interakcije ili intermolekularne disulfidne veze, uključujući promenu u konformaciji proteina. Prema Rahmanu i sar. (2020), prikazano je da ultrazvuk velike snage izaziva promenu strukture proteina i njegove funkcionalnosti putem međumolekularnih interakcija. U poslednjih nekoliko decenija, studije o ekstrakciji proteina ultrazvukom su raznovrsne. Postoje brojni radovi u literaturi koji opisuju dobijanje proteinskog izolata soje korišćenjem ultrazvučnog tretmana (Zhong et al., 2021).

Struktura i funkcionalnost proteina iz drugih biljaka kao što su izolat perile (Zhao i sar. 2022), sačma od suncokreta (Dabbour i sar. 2021) i nusproizvodi kalifornijske pastrmke (Pezeshk et al. 2021) takođe su ispitani nakon tretmana ultrazvukom. Cao i sar. (2021) su opisali uticaj ultrazvuka na strukturu i karakteristike kvaliteta oksidacionih agregata proteina kinoa. Pošto je ultrazvučna tehnologija efikasna u ekstrakciji termolabilnog proteina, korišćena je za proizvodnju hidrolizata proteina iz pirinčanih mekinja (Fathi i sar. 2021). Takođe, Tang i sar. (2021a) ispitali su efekte ultrazvučnog tretmana na fizičko-hemijska svojstva proteina rastvorljivog u vodi, a dobijenog iz semena *Moringa Oleifera*.

Frekvencija od 20 kHz se smatra niskom frekvencijom (20–100 kHz) i obično se bira pri dobijanju proteina. Visoka frekvencija ultrazvuka (100 kHz–1 MHz) može dovesti do promene fizičko-hemijskih svojstava hrane. To se dešava zbog intenzivnih hidrodinamičkih sila smicanja, pritiska i temperature u visokofrekventnom ultrazvučnom sistemu (Meng i sar., 2021).

### 3.6.2. Enzimski predtretman

Ekstrakcija biomolekula potpomognuta enzimima iz biljaka je potencijalna alternativa konvencionalnim metodama ekstrakcije rastvaračem i dobija više pažnje jer je efikasna, benigna, održiva i ekološki prihvatljiva tehnologija ekstrakcije. Ovakva ekstrakcija zavisi od karakterističnih osobina enzima da prouzrokuju reakcije sa tačnom specifičnošću, regionalnom selektivnošću i njihovom sposobnošću da reaguju pod blagim uslovima uz zadržavanje bioloških potencijala bioaktivnih jedinjenja.

Osnovni princip enzimske ekstrakcije je hidrolitička degradacija ćelijskog zida biljne ćelije, koristeći enzim kao katalizator pri optimalnim eksperimentalnim uslovima, kako bi se oslobodile intracelularne komponente. Ćelijski zid biljne ćelije predstavlja supstrat koji se vezuje za aktivno mesto enzima. Ovo dovodi do promene oblika enzima tako da se supstrat uklapa u njegovo aktivno mesto, uzrokujući njihovu maksimalnu interakciju, što dalje izaziva kidanje veza ćelijskog zida i pri tome oslobađanje aktivnih sastojaka iz samog zida (Sheldon i van Pelt, 2013).

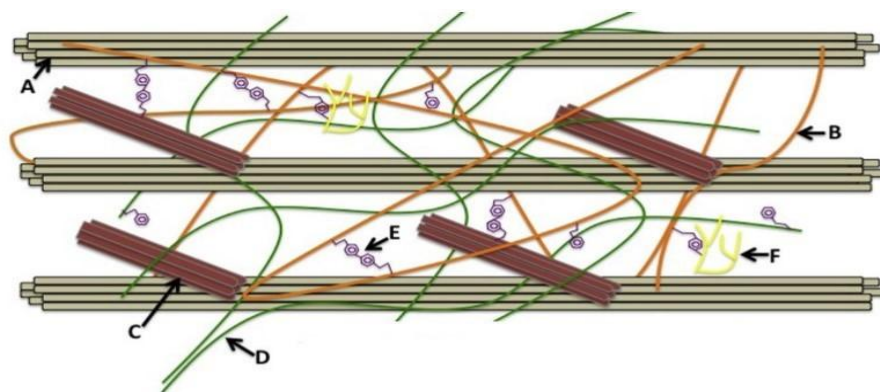
Ove metode zelene ekstrakcije ne samo da smanjuju potrebu za opasnim rastvaračima, već ih odlikuje i kraće vreme ekstrakcije. Pored toga, pošto se ova ekstrakcija izvodi pri kontrolisanim temperaturnim uslovima, veoma je korisna za ekstrakciju termolabilnih molekula kao što su arome, pigmenti, ulja, itd. Takođe, metode ekstrakcije potpomognute enzimima su pokazale nižu

potrošnju energije, veću brzinu ekstrakcije, veći prinos ekstrakcije u poređenju sa tradicionalnim metodama (Puri i sar., 2012).

Za hidrolizu ugljenih hidrata se generalno koristi širok spektar enzima. Celulaza je korišćena za ekstrakciju ulja iz semenki grožđa; pankreatin za ekstrakciju likopena iz paradajza (Dehghan-Shoar i sar., 2011). Enzimi kao što su ksilanaza, amilaza, papain, pektinaza i hemicelulaza se takođe koriste kao pretretman ekstrakcije kako bi se maksimizirao prinos ekstrakcije (Sowbhagia & Chitra, 2010). Radni uslovi kao što su temperatura reakcije, vreme ekstrakcije, pH sistema, koncentracija enzima i veličina čestica supstrata su kritični za proces ekstrakcije (Mhiri i sar., 2014).

### 3.6.2.1. Enzimi i parametri koji utiču na ekstrakciju biomolekula

Generalno, biomolekuli u prirodnim proizvodima su prisutni u obliku nerastvorljivih ili rastvorljivih konjugata (glikozidi). Na primer, većina fenola (24% ukupnog sadržaja fenola) je prisutna u obliku vezanih fenola u matriksu u hrani. Većina fenolnih jedinjenja je zarobljena u polisaharidima ćelijskog zida kao što su celuloza, hemiceluloza i pektin koji su povezani hidrofobnim interakcijama i vodoničnim vezama. Druge fenolne kiseline formiraju etarske veze sa ligninom preko svojih hidroksilnih grupa u aromatičnom prstenu i estarske veze sa strukturnim ugljenim hidratima i proteinima preko svojih karboksilnih grupa (Slika 8).



Slika 8. Primarna struktura ćelijskog zida biljnog materijala i umrežavanje između strukturnih komponenta i fenolnih jedinjenja. (A) Celuloza, (B) Hemiceluloza, (C) Strukturni proteini, (D) Pektin, (E) Fenolne kiseline, (F) Lignin (Acosta-Estrada i sar. 2014)

U slučaju flavonoida, oni su kovalentno povezani glikozidnom vezom sa šećernim delovima preko OH grupe (O-glikozidi) ili preko ugljenik-ugljenik veza (C-glikozidi). Tanini imaju tendenciju da formiraju jake komplekse sa proteinima. Otuda se enzimi kao što su celulaza, hemicelulaza, pektinaza i proteaza koristi se da rastvore ćelijski zid biljke i na taj način ubrzaju oslobađanje intracelularnih biomolekula.

Celulaze (kao što su endoglukanaze, celobiohidrolaze, b-glukozidaze), hemicelulaze (kao što su endoksilanaze i b-ksilozidaze) i pektinaze (kao što su pektintranseliminaza, poligalakturonaza i pektinesteraza) mogu se koristiti za izolovanje ulja i proteina. Ovi enzimi nasumično napadaju unutrašnja mesta amorfne regije polisaharidnih lanaca. Ovo dovodi do stvaranja malih oligosaharida različitih dužina koji olakšavaju oslobađanje zarobljenih molekula (Fernandes i Carvalho, 2017).

Efikasnost ekstrakcije u velikoj meri zavisi od sistema rastvarača, temperature, načina delovanja enzima, trajanja ekstrakcije, dostupnosti supstrata i vrednosti pH.

Optimalni pH za enzimsku hidrolizu je različit za svaki enzim. Optimalni pH mnogih enzima je u opsegu izoelektričnog pH proteina (Tallei i Alekov, 2010). Pošto su proteini veoma nerastvorljivi u ovom opsegu pH, oslobađanje biomolekula može biti otežano. Prema tome, pH mora biti odabran na takav način da ne samo da ometa funkcionisanje enzima, već i da nije u opsegu izoelektrične tačke proteina (Nadar, Pavar & Rathod, 2017).

Pored pH, temperatura je parametar koji se ne može zanemariti tokom ekstrakcije. Rad na povišenim temperaturama uzrokuje postepeni gubitak aktivnosti enzima zajedno sa denaturacijom proteina i drugih bioaktivnih sastojaka (Peterson et al., 2007). Izvođenje ekstrakcije na nižim temperaturama ne ubrzava dejstvo enzima što posledično dovodi do manje efikasnosti ekstrakcije biomolekula.

Produženje vremena delovanja enzima može poboljšati rastvaranje komponenti ćelijskog zida. Međutim, u industrijskim razmerama, veoma dugo vreme inkubacije bi dovelo do lošijeg kvaliteta proizvoda i energetske neefikasnosti. Sa druge strane (Zhang i sar. 2009) neki autori su dokazali da se prinos smanjuje sa dužim delovanjem enzimskog tretmana.

### 3.6.2.2. Enzimaska ekstrakcija proteina

Kao što je već napomenuto mogu da se koristiti različite metode za ekstrakciju proteina iz biljaka, ali izbor odgovarajuće metode zavisi od faktora kao što su rastvorljivost, hidrofobnost, molekulska težina i izoelektrična tačka (pI) proteina (Nadar, Pavar i Rathod, 2017).

Prisustvo krutog ćelijskog zida deluje kao barijera u oslobađanju ćelijskih proteina. Dakle, potpuna soljubilizacija i ekstrakcija proteina zavise od degradacije ćelije. Biljna tkiva sadrže visoke nivoe proteaza koje mogu ometati ekstrakciju i prečišćavanje proteina. Takođe prisustvo određenih kontaminirajućih jedinjenja može dovesti do razgradnje proteina što dovodi do gubitka njihove aktivnosti (Wijesinghe i Jeon, 2012). Komercijalno proizvedeni koncentri proteina obično se sastoje od proteina u vodenom rastvoru, što čini vodu kao rastvarač izbora za ekstrakciju. Prinos ekstrakcije proteina može se dalje povećati korišćenjem vodene ekstrakcije proteina uz pomoć enzima. Za oslobađanje proteina iz biljnih supstrata mogu se koristiti različite karbohidraze i proteaze.

Postoji veliki broj radova kojim je prikazana primena ovih enzima u cilju povećanja prinosa proteina. Tabela 2 prikazuje primere primene enzimski potpomognute ekstrakcije proteina iz biljaka, navodeći izvor proteina, korišćeni enzim i prinos proteina dobijen nakon ekstrakcije.

Izvor i protein	Eksperimentalni uslovi	Primenjeni enzim	Prinos (%)	Referenca
Uljana repica, soja, mikroalge	pH: 12, Temp: 40°C Koncentracija enzima: 5% Time: 24 h	Protex 40XL®, Protex P®, i Protex 5L®	15–30%	(Sari i sar., 2013)
Peptidi inhibitori $\alpha$ -amilaze Pinto pasulja	pH: 7,5, Temp: 50°C, E/S: 10 (w/ w) Vreme: 30 min	Protamex®	57,5%	(Ngho i Gan, 2016)
Lunazin i Bowman-Birk inhibitor proteaze	pH: 9,0, Temp: 50°C, E/S: 6 (w/w) Vreme: 1 h	Proteaza	89–96%	(De Moura i sar., 2011)



Izvor i protein	Eksperimentalni uslovi	Primenjeni enzim	Prinos (%)	Referenca
Protein soje	pH: 9,0, Temp: 50°C, E/S: 6 (w/w) Vreme: 1 h	Proteaza	97%	(De Almeida, De Moura Bell, i Johnson, 2014)
Protein soje	pH: 9,0, Temp: 50°C, E/S: 6 (w/w) Vreme: 1 h	Proteaza	87,6%	(De Moura, Campbell, De Almeida, Glatz, i Johnson, 2011)
Protein kikirikija	pH: 9,5, Temp: 60°C, E/S: 5 (w/w) Vreme: 90 min	Alcalase 2.4L®	88,21%	(Jiang i sar., 2010)
Pogača uljane repice	pH: 9,0, Temp: 60°C, E/S: 1 (w/w) Vreme: 80 min	Viscozyme L® i Alcalase 2.4L®	96,6%	(Niu i sar., 2012)
Seme <i>Moringa oleifera</i>	pH: 9,0, Temp: 45°C, E/S: 8 (w/w) Vreme: 120 min	Protex 7L®, Multifect CX 13L®, Viscozyme L®, Kemzyme® and Natuzyme®	75,4%	(Latif i sar., 2011)
Protein uljane repice	pH: 10,0, Temp: 48°C, E/S: 4 (w/w) Vreme: 4 h	Pektinaza, celulaza i β-glukanaza	80–83%	(Zhang i sar., 2007)
Protein iz pirinčanih mekinja	pH: 10,0, Temp: 55°C, E/S: 7.5 (w/w) Vreme: 2 h	Fitaza i ksilanaza	74,6%	(Wang, Hettiarachchy, Qi, Burks, & Siebenmorgen, 1999)

Tabela 2. Primeri enzimske ekstrakcije proteina

Jung i saradnici koristili su pektinazu da poboljšaju sposobnost ekstrakcije sojinog proteina bez degradacije proteina, u laboratorijskim i pilot razmerama. Prinos proteina je povećan za 50% u poređenju sa kontrolom uz poboljšanje stabilnosti pene. Enzimski koktel pektinaze i celulaze nije doprineo povećanju prinosa proteina u odnosu na pojedinačnu upotrebu tih enzima (Jung i sar., 2006).

Utvrđeno je značajno poboljšanje u prinosu proteina korišćenjem komercijalnog koktela enzima (karbohidraza) u alkalnoj ekstrakciji proteina iz sojinog zrna. Ovako dobijeni izolat pokazao je

bolje osobine u pogledu rastvorljivosti, emulzionih osobina i formiranja pene od izolata sojinih proteina dobijenih uobičajenom metodom alkalne ekstrakcije (Perović i sar. 2020.).

Viscozyme®L predstavlja karbohidrazu, kompleks enzima za degradaciju ćelijskog zida, koji sadrži arabinazu, celulazu, hemicelulazu i ksilanazu. Nekoliko studija koje pokazuju efikasnost upotrebe celulaze prikazane su u literaturi (Ansharullah i sar., 1997; Rosset i sar., 2014). Studija Zhang et al., (2016) pokazala je efikasnost predtretmana sa Viscozyme®L na ekstrakciju proteina iz ostataka zelenog čaja. Takođe, enzimska ekstrakcija pomoću Viscozyme®L iz odmašćenih listova Moringe Oleifere dala je koncentrat proteina koji je bio svarljiv i imao je izbalansiran sastav aminokiselina u skladu sa zahtevima FAO za kvalitet proteina (Tassadit i sar., 2021). Celluclast 1.5L sadrži pretežno celulaze (jedinice endo-glukanaze) i utvrđeno je da je efikasan u ekstrakciji pektina iz zidova biljnih ćelija. On razlaže celulozne materijale u ćelijskim zidovima i pretvara ih u glukozu. Endo-glukanaza interno hidrolizuje celulozni lanac i proizvodi oligosaharide, celobiozu i glukozu. Primenom ovog enzima, opisano je poboljšanje ekstrakcije proteina iz listova masline optimizujući različite parametre ekstrakcije. Pectinex Ultra SP-L predstavlja kompleks enzima koji sadrži poligalakturonazu, pektinesterazu i pektin trans-eliminazu i u manjoj meri hemicelulazu i celulozu. Aica Akiuz i saradnici (2018) opisali su ekstrakciju potpomognutu enzimima iz lista šećerne repe korišćenjem ovog enzima za dobijanje koncentrata proteina koji bi mogli imati potencijalnu upotrebu u prehrambenoj industriji.

Takođe različite proteaze su korišćene za ekstrakciju proteina iz pogače uljarica poput uljane repice, soje i mikroalgi. Za ekstrakciju je korišćeno pet različitih mešavina enzima proteaze – Protek 40KSL®, Protek P®, Protek 5L®, Protek 50FP® i Protek 26L®. Više proteina je ekstrahovano u alkalnoj sredini, u poređenju ekstrakcijom u kiseloj sredini.

Na alkalnoj vrednosti pH, 80% proteina sojine sačme i 15 - 30% proteina sačme repice i mikroalgi ekstrahovano je bez dodavanja enzima. Dodatkom enzima, prinos ekstrakcije proteina se povećao na 90% za sojinu sačmu i 50-80% za sačmu od uljane repice i iz mikroalgi. Slično, Zhang et al. koristio Alcalase® (endo - proteaza) nakon čega je usledio tretman karbohidrazama (kombinacija celulaze, b-glukanaze i pektinaze) semena repice (porodica Cruciferae) da bi se ubrzala hidroliza proteina da bi se razbila emulzija i istovremeno dobio veći prinos slobodnog ulja (73 – 76%) i proteinskog hidrolizata (80 – 83%) u sistemu vodene enzimske ekstrakcije

(Zhang i sar., 2007). Na ekstrakciju proteina najviše su uticali spoljni faktori kao što su pH, vrsta biomase i dodatak enzima.

Iz svih gore navedenih primera može se zaključiti da bi ekstrakcija podpomognuta enzimima uspešno mogla da se koristi za izolovanje proteina iz biljnih izvora i povećanje njihovog prinosa (Ngho i Gan, 2016).

### 3.8. Funkcionalne osobine proteina

*Upotreba proteina i peptida kao sastojka u hrani u velikoj meri zavisi od funkcionalnih svojstava (kao što su geliranje, emulgovanje, penjenje, rastvorljivost) koja su povezana sa fizičko-hemijskim svojstvima. Stoga je neophodno koristiti blage uslove obrade prilikom izolovanja proteina kako bi se sačuvao njihov sastav, funkcionalnost konformacije i biološka svojstva. U ovom poglavlju prikazana je klasifikacija funkcionalnih osobine proteina zajedno sa primerima funkcionalnih osobina iz literature.*

Funkcionalne osobine definisane su kao „ona fizička i hemijska svojstva koja utiču na ponašanje proteina u prehrambenim sistemima tokom obrade, skladištenja, pripreme i konzumiranja“ (Kinsella, 1976). Damodaran (1997) je izjavio da „fizičko-hemijska svojstva koja utiču na funkcionalno ponašanje proteina u hrani uključuju njihovu veličinu, oblik, sastav i sekvencu aminokiselina, neto naelektrisanje, raspodelu naelektrisanja, hidrofobnost, hidrofilnost, strukture (sekundarne, tercijarne i kvaternarne), molekulska fleksibilnost/krutost kao odgovor na spoljno okruženje (pH, temperature, koncentracija soli) ili interakcija sa drugim sastojcima hrane“. Zbog velike raznolikosti funkcija proteina hrane, definicije ne mogu da opišu sve moguće funkcionalne osobine (Sathe, 2002).

Na ponašanje proteina tokom prerade, proizvodnje i skladištenja utiču molekulske osobine (Morr, 1990). Veličina proteina u korelaciji je sa međufaznim interakcijama i snagom filmova. Amfifilna svojstva proteina usko su povezana sa raspodelom polarnih i nepolarnih ostataka, sa međufaznim interakcijama i utiču na formiranje pene i emulgovanja, kao i odbijanje mehurića u penama, hidrataciju i rastvorljivost u vodi. Sastav aminokiselina određuje organoleptička i antioksidativna svojstva. Aspekt vezan za veličinu aminokiselina je njihov ukus, zbog sternog isključivanja određenih enantiomera iz receptora ukusa (Birch i Kemp, 1989).

U klasifikacijama funkcionalnih osobina, obično se uzima u obzir uticaj molekulskih osobina na strukturu i funkciju proteina, ali i nutritivne vrednosti (sastav aminokiselina, prisustvo inhibitora ili antinutritivnih faktora kao i kvalitet proteina), organoleptičke i biološke osobine (antioksidativne, terapijske) takođe mogu biti uključene. Funkcionalne osobine mogu se grupisati u kategorije prema fizičko-hemijskim svojstvima na koje utiču. Ova klasifikacija, predložena od strane Damodaran (1997) i Hettiarachchi i Kalapathi (1998), široko je primenjena.

Funkcionalne osobine mogu se klasifikovati prema mehanizmu delovanja na tri glavne grupe:

1. osobine povezane sa hidratacijom (apsorpcija vode/ulja, rastvorljivost, zgušnjavanje, vlažnost)
2. osobine povezane sa strukturom proteina i reološkim karakteristikama (viskoznost, elastičnost, adhezivnost, agregacija i geliranje) i
3. osobine povezane sa površinskom aktivnosti proteina (aktivnosti emulgovanja i penušanja, stvaranje proteinsko-lipidnih filmova, sposobnost mućenja (*whippability*)). Takođe se može razmotriti još neka grupa osobina koje su povezane sa kompatibilnošću sa drugim komponentama hrane, enzimskom i antioksidativnom aktivnošću.

### **3.9.1. Funkcionalne osobine povezane sa mehanizmima hidratacije**

Nativna struktura proteina posledica je interakcija aminokiselina sa vodom i neke funkcionalne osobine mogu da se tumače kao rezultat protein-voda interakcija koje su termodinamički povoljne (vlažnost, bubrenje (oticanje), zadržavanje vode i rastvorljivost) ili nepovoljne (penjenje, emulgovanje). Ostale osobine koje odražavaju interakciju polimera proteina sa vodom su viskoznost, geliranje i koagulacija (Damodaran, 1997). Mattos (2002) je ukazao na značaj dinamike vode u odnosu na strukturu proteina i prilagođavanje na proteinsko okruženje.

Kapacitet adsorpcije vode i ulja predstavljaju sposobnost vode i ulja da se vežu na bočne lance proteina. Ovi funkcionalni parametri često se koriste za opisivanje mogućih primena proteina.

#### **Kapacitet adsorpcije vode**

Kod primene u hrani kapacitet zadržavanja vode povezan je sa sposobnošću zadržavanja vode protiv gravitacije, i uključuje vezanu vodu, hidrodinamičku vodu, kapilarnu vodu i fizički zarobljenu vodu. Količina vode koja se vezala za proteine usko je vezana sa njihovim aminokiselinskim profilom i povećava se sa brojem naelektrisanih ostataka (Kuntz i Kauzmann, 1974). Takođe na ovu osobinu utiču i konformacija, hidrofilnost, pH, temperatura, jonska jačina i koncentracija proteina (Damodaran, 1997).

U većini prehrambenih proizvoda vezivanje vode je važno jer određuje teksturu hrane. Sa malim kapacitetom vezivanja vode, proizvod će biti suv i/ili će izgubiti vodu tokom skladištenja. Za

karakteristike koje se tiču osećaja strukture hrane u ustima interakcija između vode/ulja i proteina veoma je značajna u pekarskim proizvodima (Suresh Kumar i sar., 2014), poput hleba i kolača, i u lepljivim svojstvima lepljive hrane poput supa ili proizvoda od slatkiša (Adebowale, 2005).

Adsorpcija vode proteina lišća koji je u nativnom stanju ima veoma niske vrednosti. Douillard i Mathan (1994) ukazuju na to da nema značajne razlike u adsorpciji vode kod proteina lišća koji su osušeni sa freeze dried ili spray dried tehnikama sušenja na niskoj temperaturi (85°C) što je u korelaciji sa njihovom odličnom rastvorljivošću. Uzorak koji je sušen raspršivanjem na 140 °C imao je kapacitet adsorpcije vode od 428% zapremine u poređenju sa 612% za izolat proteina soje. Veća vrednost kapaciteta adsorpcije vode sugerise da je protein verovatno denaturisan i agregiran. Svi komercijalni izolati proteina soje su delimično denaturisani, što objašnjava njihov kapacitet vezivanja vode pre zagrevanja. Proteini lišća duvana takođe pokazuju sposobnost vezivanja vode koji je u rangu izolata proteina soje (Sheen, 1985), ali to zavisi i od postupka izolacije i najverovatnije od delimičnog odvijanja proteina.

### **Kapacitet adsorpcije ulja**

Sposobnost proteina da vežu ulje važno je funkcionalno svojstvo u primeni u prehrambenoj industriji. Kao primer su zamena i dodaci mesu, uglavnom zato što poboljšavaju zadržavanje ukusa i poboljšavaju osećaj u ustima prilikom konzumacije proizvoda. Adsorpcija ulja obično se meri dodavanjem ulja proteinskom prahu, nakon toga ide temeljno mešanje, zatim centrifugiranje i na kraju se određuje količina vezanog ili apsorbovanog ulja (de Jong i Nieuwland, 2011).

Kao primer kapaciteta adsorpcije ulja za protein lišća lucerke treba istraći da je veći u odnosu na izolat proteina soje (Knuckles, 1982), međutim treba napomenuti da je veoma bitan postupak pripreme proteina, jer je za dva uzorka proteina lišća lucerke kapacitet adsorpcije ulja bio veći, ali za jedan uzorak nizi u odnosu na izolat proteina soje (Sheen, 1985).

## Rastvorljivost

Balans hidrofilnosti/hidrofobnosti, koji zavisi od aminokiselinskog sastava, posebno na površini proteina, utiče na njegovu rastvorljivost. Veća rastvorljivost može da bude usled prisustva malog broja hidrofobnih ostataka, povišenog naelektrisanja i elektrostatičke odbojnosti kao i jonske hidratacije koja nastaje kada je pH iznad i ispod izoelektrične vrednosti pH. Denaturacija utiče na rastvorljivost proteina zbog promena odnosa hidrofobnosti/hidrofilnosti na njihovoj površini. U literaturi su opisane metode koje su dostupne za procenu denaturacije proteina (Kilara i Sharkasi, (1986)). Usoljavanje i isoljavanje (*salting-in i salting-out*) povezani su sa karakteristikama na površini proteina, takođe utiču na rastvorljivost proteina, što utiče na zgušnjavanje, emulgiranje, penjenje i geliranje (Damodaran, 1997).

Rastvorljivost proteina je jedna od najvažnijih funkcionalnih osobina, zbog uticaja na druge funkcionalnosti kao što su emulgovanje, penjenje, geliranje. Stoga ove karakteristike utiču i na različita hranljiva svojstva kao što su ukus, tekstura i mnoga druga (Kinsella, 1982). Protein koji npr. zagrevanjem postaje potpuno nerastvorljiv, gotovo da ne poseduje nikakvu funkcionalnost. Rastvorljivost proteina lišća zavisi od mnogih faktora: pH, temperature, jonske jačine, prisustva dvovalentnih katjona, koncentracije proteina kao i od vrste iz koje je protein izolovan (Sheen, 1991). Na primer, tretman dvovalentnim magnezijumom uzrokuje da se protein lišća poreklom iz duvana potpuno istaloži pri pH vrednostima ispod 7,5 (efekat pH i dvovalentnih katjona), dok je isti efekat na protein lišća spanaća bio mnogo manji (što predstavlja efekat vrsta). Protein lišća lucerke najmanje je rastvorljiv blizu izoelektrične tačke (pH od 5 do 6,5), rastvorljiv je do 20% u kiseljoj sredini a u alkalnoj sredini primećuje se porast rastvorljivosti između 10 i 90%, sa pH 7 na 12 (Prévot-D'Alvise i sar., 2004). Protein lišća soje nakon alkalne ekstrakcije pokazivao je rastvorljivost ispod pH 2 i iznad pH 6 (Betschar, 1973).

Takođe kod rastvorljivosti koja zavisi od pH vrednosti, predtretman koji se koristi u izolovanju proteina kao i vrsta biljnog izvora igraju vaznu ulogu. Na primer, za lišće soje rastvorljivost se ne menja između pH 8 - 11 (Betschar, 1973). Takođe proces prečišćavanja, kao i način taloženja i sušenja proteina utiče na varijacije rastvorljivosti kao kod proteina koji je izolovan iz lišća lucerke. Posle sušenja raspršivanjem na 85°C rastvorljivost je bila uporediva sa liofilizovanim uzorcima. Međutim, povećavajući temperaturu raspršivanjem na 95°C ili 140°C dramatično se smanjuje rastvorljivost (Knuckles, 1982).

Protein lišća duvana ostaje rastvorljiv i pored produženog ključanja (Sheen, 1991), ali protein lišća lucerke ima temperaturu denaturacije 76,2°C, a takođe i protein lišća spanaća je toplotno nestabilan (Barbeau, 1990). Pod odgovarajućim uslovima, protein lišća duvana je bio bolje rastvorljiv od izolata proteina soje (Sheen, 1985). Međutim koraci prečišćavanja mogu značajno smanjiti rastvorljivost. Sve u svemu teško je generalizovati podatke, jer zavise od mnogih parametara.

### **3.9. Funkcionalne osobine povezane sa strukturom proteina i reologija**

#### **Viskoznost i zgušnjavanje**

Nekoliko autora opisalo je kako rastvorljivost, hidrodinamička svojstva, hidrofobnost i mikrostruktura proteina igraju važnu ulogu u reološkim osobinama proteina (Krause, Bagger i Schvenke, 2001; Krase i sar., 2002; Paulson i Tung, 1989; Vojdani, 1996). Añón, Sorgentini i Vagner (2001) sugerišu da očigledna viskoznost komercijalnih i laboratorijskih izolata soje zavisi od interakcija između rastvorljivih i nerastvorljivih proteina u vodi. Viskoznost se eksponencijalno povećava sa povećanjem koncentracije proteina verovatno zbog povećane interakcije hidriranih proteina, adsorpcije vode i bubrenja (Kinsella, 1979). Añón i sar. (2001) prikazuju da kada odnos ukupna voda/upijena voda teži da bude 1, sa nekoliko različitih koncentracija proteina, dovodi do povećanja prividne viskoznosti. Malhotra i Coupland (2004) pokazuju efekat površinski aktivnih materija i pH vrednosti na viskozitet izolata proteina soje. Povećanje rastvorljivosti proteinskog izolata dodavanjem jednog surfaktanta uključuje veće vrednosti viskoziteta. Pa tako, i alkalne vrednosti pH vode dovode do bolje vrednosti viskoziteta. Bubrenje i sposobnost zauzimanja vode sugerisane su kao važan faktor koji doprinosi viskozitetu (Sousa i sar, 1996). Delimična denaturacija proteina povećava viskozitet proteina zbog proširene hidrodinamičke površine koja je nastala razmotavanjem proteina. (Schvenke i sar., 1990).

#### **Geliranje**

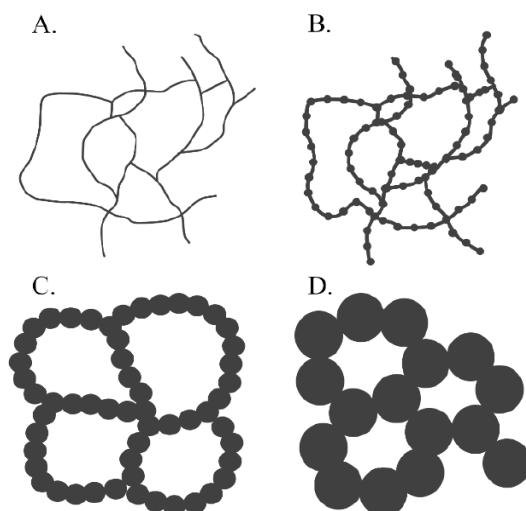
Gel se može definisati kao srednje stanje, između čvrstog i tečnog. Gelovi se takođe nazivaju „meke čvrste materije“ (*soft solids*), zbog ponašanja nalik čvrstom materijalu, i „čvrsta voda“ (*solid water*), zbog visokog odnosa vode u odnosu na ostale komponente. Gelovi nastaju kada polimeri u rastvoru međusobno deluju i formiraju mrežu u kojoj je zarobljena tečnost (Aguilera i Stanlei, 1999). Gelovi koji se najčešće susreću u prehrambenim sistemima su hidrogelovi, gde je



zarobljena tečnost voda. Ako se voda pažljivo ukloni, formira se kserogel, a u slučajevima kada je kontinualna faza masna, gel se naziva lipogel (Nynäs, 2018).

U prehrambenim sistemima tečnost je voda a molekularnu mrežu formiraju proteini, polisaharidi ili mešavina oba. Proteini su efikasniji gelirajući agensi od ugljenih hidrata zato što su veliki molekuli sposobniji da formiraju umrežene veze u tri dimenzije. Geliranje favorizuje veličina proteina, jer veliki molekuli formiraju široke mreže umrežavanjem u tri dimenzije, kao i zbog dobre fleksibilnosti i sposobnosti denaturacije (Oakenfull i sar., 1997). Da bi formirali gelove, delimično geliranje se dešava na granici između agregacije i rastvorljivosti (Hegg, 1982), takođe za formiranje gela delimična denaturacija je poželjna, pošto se razmotavanjem tercijarne strukture dobijaju dugi lanci proteina bez prekida kovalentnih veza. Ostali faktori koji utiču na geliranje su pH, jonska jačina, temperatura prisustvo redukcionih sredstva, uree, , ne-proteinskih komponenata i mehaničke sile primenjene na sistem (Damodaran, 1988; Sathe, 2002).

Struktura proteinskih gelova može se približno podeliti na finolančane i partikularne gelove (čestične), kao što je prikazano na Slici 9. Finolančani gelovi su obično transparentni (prozirni) a partikularni gelovi su netransparentni. Gelovi mogu biti mešavina između finolančanih i partikularnih gelova, ali veličina agregata u partikularnim gelovima obično je relativno uniformna. Međutim, veličina agregata u drugim gelovima može da varira u zavisnosti od proteina i uslova okoline. Struktura gela zavisi od pH i jonske jačine, a više sile odbijanja daju uređeniju strukturu niti (Zaias, 1997). U blizini izoelektrične tačke proteina, formirani gelovi biće manje hidratizovani i manje čvrsti. Na primer, protein mleka  $\beta$ -laktoglobulin može da formira kako finolančane, tako i partikularne gelove u zavisnosti od pH i koncentracije soli (Langton i Hermansson, 1992; Langton i Hermansson, 1996).



Slika 9. Različite mrežne strukture gela uobičajene u biopolimernim gelovima. A. Finolančana mreža B. Finolančana agregatna mreža, C. i D. Mreže čestica (Hermansson, 1994).

Da bi formirali trodimenzionalnu mrežu gela, proteini moraju biti u mogućnosti da formiraju intermolekulske interakcije. Stabilni gelovi se drže zajedno vodoničnim vezama, jonskim i hidrofobnim interakcijama, van der Valsovima interakcijama i kovalentnim disulfidnim vezama. Delimična denaturacija proteina npr. zagrevanjem će izložiti sakrivene hemijski aktivne grupe, npr. sumporne grupe, koje mogu formirati kovalentne veze između molekula, što dovodi do formiranja gumenih gelova. Koncentracija proteina je ključna u procesu geliranja. Ukoliko je koncentracija proteina preniska intraproteinske interakcije mogu da budu favorizovane u odnosu na interproteinske interakcije (Nynäs, 2018).

Prečišćeni protein lišća, (RuBisCO), poseduje odlične gelirajuće sposobnosti (van de Velde, 2011). Proteini RuBisCO geliraju u nižoj koncentraciji u poređenju sa proteinima soje i surutke. Ovi rezultati se slažu sa rezultatima u literaturi u vezi sa gelirajućim ponašanjem u kojem je RuBisCO ekstrahovan u laboratorijskim razmerama. Rezultati pokazuju da pri pH 7 geliranje zagrevanjem RuBisCO započinje sa oko dva procenta w/w proteina, dok za proteine surutke započinje tek oko 10% w/w proteina, a za protein soje sa koncentracijom većom od 12% w/w proteina. Veliki potencijal prečišćenog RuBisCO-a za geliranje omogućava moguću primenu u dezertima, namenjenim vegetarijanskim potrošačima i sa oznakom niske alergenosti (van de Velde, 2011).

### **3.10. Funkcionalne osobine povezane sa površinskom aktivnosti proteina**

Proteini imaju različitu površinsku aktivnost, a u vezi je sa njihovom konformacijom i sposobnošću da se odmotavaju na granici gaza koji su određeni molekulskim faktorima (fleksibilnost, konformaciona stabilnost, raspodela hidrofilnih i hidrofobnih ostataka u primarnoj strukturi) i spoljašnjim faktorima (pH, jonska jačina, temperature, moguća konkurentna adsorpcija drugih proteina ili lipida u interfejsu) (Damodaran, 1997; van Vliet i sar., 2002).

#### **Kapacitet formiranja pene**

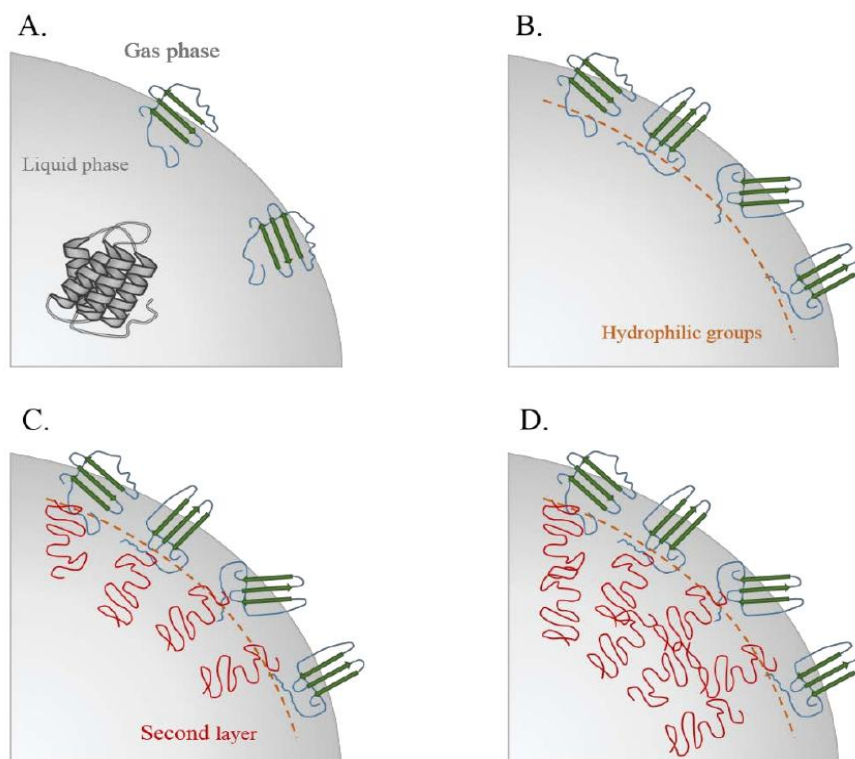
Pene nastaju kada se vazduh uvodi u rastvor koji sadrži površinski aktivna jedinjenja, što dovodi do stvaranja mehurića koji su dispergovani u tečnoj kontinualnoj fazi (Damodaran, 2005). Prilikom formiranja pene najviše su zastupljeni mehurići sfernog oblika, ali nakon podređenog vremena, ako su dovoljno stabilni, mehurići formiraju poliedarske oblike sa tankim lamelama tečnosti između (Damodaran, 1997).

Međufazna površina između mehurića mora biti stabilizovana, inače će stvoreni mehurići odmah popucati, što je slučaj i sa emulzijama. Stabilnost pene u velikoj meri zavisi od čvrstoće i fleksibilnosti filma na granici faza vazduh-tečnost. Bez stabilizatora, pena se razrušava usled njihovog termodinamički nestabilnog stanja (Vilde, 2000). Čak i ukoliko postoji dobra stabilizacija, pena će se tokom vremena razrušiti usled jednog ili nekoliko mehanizama drenaže, koalescencije ili ukрупnjavanja mehurova.

U prehrambenim proizvodima proteini su glavna površinski aktivna sredstva potrebna za stabilizaciju gasovito dispergovane faze. Kapacitet pene određen je sposobnošću proteina da smanji površinski napon, molekulskom fleksibilnošću i fizičko-hemijskim svojstvima (hidrofobnost, neto naelektrisanje i raspodela naelektrisanja, hidrodinamička svojstva) (Graham i Philips, 1976). Proteini koji imaju dobre osobine formiranja pene moraju (i) brzo da se adsorbuju tokom mućenja i formiranja mehurića, (ii) da imaju brzu konformacionu promenu, preuređujući se na granici faza vazduh-voda sa smanjenjem površinskog napona i (iii) da formiraju viskoelastični kohezioni film kroz intermolekulske interakcije (Hettiarachchy and Ziegler, 1994). Na sve ove funkcije snažno utiču molekulske osobine proteina, koje uglavnom određuju aminokiselinske sekvence, ali takođe i uslovi u kojima se nalaze proteini kao i predtretmani koji su se koristili prilikom njihovog dobijanja (Kinsella, 1981).

Stabilnost pene, koja se meri vremenom potrebnim za 50% smanjenja zapremine pene, ukazuje na sposobnost stabilizacije protiv gravitacionih i mehaničkih naprezanja (Damodaran, 1997). Kapacitet pene može da se odredi direktnim merenjem zapremine pene koja nastaje nakon mućenja ili aeracije rastvora proteina (kapacitet pene, mešanje i širenje pene, (Patel i sar, 1988; Vaniska i Kinsella, 1979) ili posrednim metodama (provodljivost).

Proces adsorpcije proteina na granici faza vazduh-voda ilustrovan je na Slici 10. Počinje formiranjem monosloja na granici faza, a brzina adsorpcije je direktno povezana sa koncentracijom proteina u masi (Iano i sar., 2008). Kada se adsorbuje, protein se može prilagoditi okolini, a u slučaju lizozima, konformacija proteina se menja u ravnu strukturu na granici faza. Kada je monosloj skoro kompletan, proteini formiraju veze, a hidrofilne grupe proteina se orijentišu ka vodenoj fazi. Po završetku monosloja, drugi sloj nastaje adsorpcijom labavo upakovanih proteina u petljaste strukture.



Slika 10. Koraci procesa adsorpcije proteina lizozima na granici faza vazduh-voda. A. Molekuli lizozima adsorbuju se u na granicu faza i njihova konformacija se menja kao rezultat

*hidrofobnih interakcija na granici faza B. Molekuli formiraju monosloj i orijentišu svoje hidrofилne delove ka vodenoj fazi. C. Drugi sloj molekula sa rastresitim slučajno namotanim strukturama se adsorbuje na prvi sloj. D. Višesloj se formira od labavo (loosely) strukturiranih molekula (Yano i sar., 2008)*

Kao što je već rečeno osobine proteina da formiraju penu zavise od nekoliko različitih faktora, jedan od njih je brzina kojom se proteini adsorbuju na granicu faza vazduh-voda i snaga njihove interakcije. Zavise i od koncentracije proteina u masi i stope adsorpcije, a optimalna koncentracija varira u zavisnosti od molekulskih osobina proteina (Vani i Zaias, 1995). Niske koncentracije omogućavaju proteinima da se adsorbuju na granicu faza vazduh-voda bez interakcija, dok je potrebno opsežnije preklapanje i petljanje (savijanje) kod veće koncentracije proteina (Vani i Zaias, 1995; Kinsella, 1981). Razmotavanje proteina na granici faza vazduh-voda javlja se samo ako je kinetika adsorpcije i razmotavanja slična, ili ako je stopa adsorpcije sporija. U slučajevima gde je proces odmotavanja sporiji u poređenju sa adsorpcijom, nema dovoljno vremena da se proteini prilagode okolini i međufazni film tada puca (Vierenga et al., 2006).

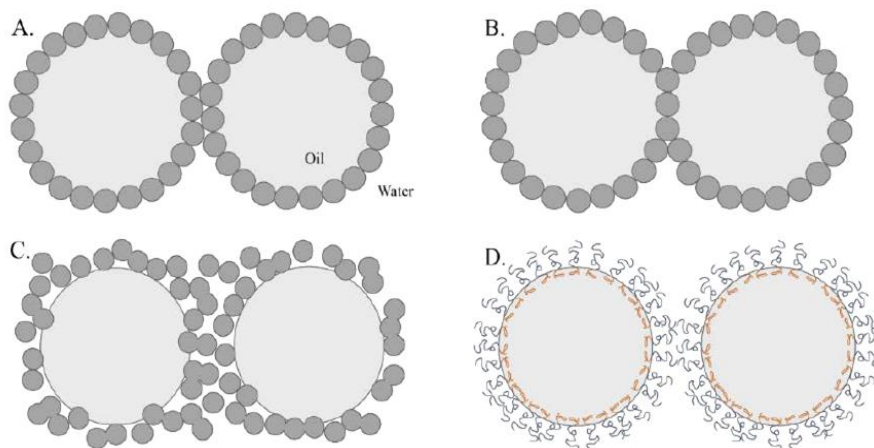
Sposobnost formiranja pene proteina lišća zavise od procedura obrade pri dobijanju proteina, ali uopšte, mogu da se porede sa već poznatim penušavim proteinima kao što je protein belanca (Barbeau, 1988; Barbeau, 1990) iako i njihova sposobnost formiranja pene zavisi od procedure obrade (Knuckles, 1982). U odgovarajućim uslovima daje istu zapreminu pene kao belance, ali sa dužom stabilnosti pene. Dalje, ponašanje pri zagrevanju je slično. Stoga, protein lišća može da se koristiti kao zamena za protein belanca. Pena je najstabilnija uz minimalne sile odbijanja, tj. blizu izoelektrične tačke ili pri velikoj jonskoj jačini (Barbeau, 1988).

Pena pripremljena sa izolatom proteina lišća porekom iz spanaća (RuBisCO) imala je veću zapreminu od pene pripremljene sa drugim komercijalnim proteinima kao što su izolati proteina soje i surutke. Mehurići su bili znatno manji prilikom korišćenja ovog proteina lišća od onih dobijenih korišćenjem proteina soje ili surutke. Suprotno proteinima soje i surutke, zapremina pene upotrebom proteina lišća spanaća bila je značajno veća pri pH 7 nego pri pH 4,5. Pored toga, utvrđeno je da je ova pena najstabilnija, pri obe vrednosti pH, bez očigledne koalescencije u prva dva sata. Što ukazuje na to da ova pena može da se koristiti kao alternativa za pene na bazi mlečnih proizvoda za primenu kao što su kafa, sladoled i deserti (van de Velde, 2011).

## Emulgujuća aktivnost i stabilnost

Emulzije se dobijaju dispergovanjem dve nemešljive tečnosti jedne u drugoj uz prisustvo agensa za stabilizaciju (McClements, 2015). Tokom homogenizacije stabilizator će se adsorbovati na granicu faza, omogućavajući dispergovanje kapljica u kontinualnoj vodenoj fazi. Zbog nemešljive prirode tečnosti, stabilnosti emulzije zavisi od jačine međufaznog filma koji razdvaja dve faze (Chung i McClements, 2014). Nedovoljna stabilizacija granice faza dovodi do spajanja kapljica (koalescencije) (kao što je prikazano na Slici 11, B.) i na kraju će doći do potpunog razdvajanja faza.

Granice faza mogu biti stabilizovane česticama (Slika 11, A-C) ili amfifilnim molekulima, tačnije molekulima sa jasnim hidrofobnim i hidrofilnim delom (Slika 11, D) (Dickinson, 2010). Jedinjenja koja se koriste kao stabilizatori u hrani uglavnom su na bazi proteina ili polisaharida. *Pickering* stabilizacija je jedan način delovanja gde se čestice adsorbuju direktno na spoljšnju površinu, formirajući jednosloj koji pokriva kapljicu kao što je prikazano na Slici 11, A. i B. Kapljice se mogu odvojiti dvoslojem čestica ili zajedničkim graničnim slojem (Dickinson, 2016). Ako je koncentracija čestica u kontinualnoj fazi visoka, one mogu da interaguju i formiraju a stabilizovanu mrežnu barijeru, pre nego jednosloj, kao na Slici 11, C. U slučaju amfifilnih molekula koji se ponašaju kao stabilizatori, na primer površinski aktivne materije i proteini, molekuli usmeravaju svoje više hidrofobne delove ka nepolarnoj fazi i adsorbuju se na granici faza, što je ilustrovano na Slici 11, D. (Lam i Nickerson, 2013). Adsorbovani proteini stabilizuju granicu faza formiranjem čvrstog filma koji emulguje kapljice, takodje stvarajući sternu prepreku i time izbegavajući spajanje kapljica.



*Slika 11. Stabilizacija granice faza u emulzijama ulje – voda . Isti principi važe i za mehuriće vazduha u tečnosti. A. Dvoslojni raspored sfernih čestica (npr. proteinski aglomerati ili granule skroba) koji prekrivaju površine kapljica ulja i B. jednosloj između dve kapljice. C. Delimično obložene površine odvojene agregatnim česticama. D. Sterno razdvajanje amfifilnim molekulima, npr. proteinima, gde se hidrofobni (crveni) delovi adsorbuju na površinu (Dickinson, 2016) (A-C) i (Lam i Nickerson, 2013) (D).*

Proteini imaju prednost u odnosu na površinski aktivne materije niske molekulske mase u svrhu emulgovanja u hrani. Sposobnost proteina da deluju kao emulgatori varira u zavisnosti od molekulskih svojstava proteina, a glavni faktori koji utiču na svojstva emulzija su molarna masa, hidrofobnost, stabilnost konformacije, naelektrisanje i fizičko-hemijski faktori kao pH, jonska snaga i temperatura (Kinsella, 1984). Rastvorljivost igra važnu ulogu, jer dosta nerastvorljivi proteini nisu dobri emulgatori i dovode do koalescencije.

Prema Kato-u i Nakai-u (1980), emulgujuća svojstva pokazuju dobru korelaciju sa prisustvom hidrofobnih ostataka na površini proteina. Prisustvo soli i pH vrednost utiču na stabilnost emulzije (Tsaliki i sar., 2004). Denaturacija bi mogla poboljšati emulgirajuća svojstva proteina, usled povećane hidrofobne površine i fleksibilnosti (Dickinson i Hong, 1994; Kilara & Sharkasi, 1986; Raimundo i sar, 1998). Na stabilnost emulzije utiče nekoliko fizički međusobno zavisnih procesa: flokulacija ili agregacija i koalescencija (Damodaran, 1997), koji utiču na razdvajanje faza, odnosno creaming, mehanizmima koje je prijavio Valstra (1988).

Većina metoda za određivanje kapaciteta emulgovanja zasnivaju se na njihovom nastanku primenom sila smicanja ili ultrazvuka i daljem određivanju emulgovane uljne faze. Količina

proteina adsorbovanog na emulgovanoj fazi i njegova stabilnost obično se mere turbidimetrijskim (Pearce i Kinsella, 1978) i konduktometrijskim metodama (Kato i sar., 1985; Linder i sar., 1996).

Osobine emulgovanja, kao i mnoge druge funkcionalnosti, zavise od predtretmana proteina. Nakon koagulacije toplotom protein lišća pokazuje loše emulgujuće osobine, ali daje dobre emulgujuće osobine nakon pH precipitacije koja je praćena liofilizacijom (Rault i sar., 1993). Protein lišća poreklom iz spanaća poseduje lošije emulgujuće osobine od osobina proteina soje (Barbeau, 1988), dok protein poreklom iz lista lucerke koji je sušen u spreju na niskoj temperaturi (85°C), pokazuje bolje emulgujuće osobine od izolata proteina soje (Knuckles i Kohler, 1982).

Lamsal i sar., (2007) opisali su da slično funkcionalnostima poput stabilnosti pene i rastvorljivosti, i svojstva emulgovanja veoma zavise od postupaka prečišćavanja. Upoređivali su pH istaložene proteine lišća u odnosu proteina lišća koji su dobijeni ultrafiltracijom. Iz elektroforeze, procenjeno je da je procenat proteina bio oko 80%. Stabilnost emulzije ultrafiltriranih uzoraka bila je skoro dvostruko bolja od taloženog proteina lista. Oba proteina imala bolje emulzione osobine (stabilnost emulzije) od proteina belanaca.

Hojilla-Evangelista i sar., (2016), prijavili su da je osušeni koncentrat proteina lišća lucerke imao je primetno visoku emulzionu aktivnost i indekse stabilnosti emulzije koji su se povećavali sa pH (pH 2, 7 i 10), što ukazuje da su se osobine emulgovanja poboljšavale kako je pH postajao alkalniji. Damodaran (1996), objasnio je da se u alkalnim uslovima dešava razmotavanje polipeptidnih lanaca, što dovodi do većeg učešća proteina u međufaznim reakcijama ulje-voda. Suprotno njegovim rezultatima, Wang i Kinsella (1976), koristeći drugačiju metodu testa emulgovanja, primetili su da emulgacioni kapacitet proteina soka od lista lucerke bio je najveći pri pH 5 i drastično je opao sa obe strane ove vrednosti pH. Emulziona aktivnost pri pH 7 osušenog koncentrata proteina iz lista lucerke bio je više nego tri puta veći od onoga što je prethodno prijavljeno za koncentrat sojinih proteina dobijenih taloženjem u kiseloj sredini (56 m<sup>2</sup>/g proteina), ali stabilnosti emulzije pri neutralnom pH bile su približno jednake za ova dva koncentrata proteina (stabilnost emulzije 19 min, odnosno 15 min) (Hojilla-Evangelista i sar., 2004). Knuckles i Kohler (1982), izvestili su ne samo o približno identičnim stabilnostima emulzije između sušenja raspršivanjem ili liofilizovanjem koncentratom proteina soka od lista



lucerke i soje, ali takođe vrlo slične vrednosti za aktivnosti emulgovanja i kapacitete emulgovanja.

### 3.10. Bioaktivni peptidi

Proteini su važan makronutrijent u hrani jer pored svoje nutritivne vrednosti ispoljavaju i dodatne zdravstvene benefite kroz oslobađanje peptida koji mogu imati biološku aktivnost a koji su “ugrađeni” u prirodnom proteinu. Generalno, bioaktivni peptidi su oligopeptidi (2-20 aminokiselinskih jedinica) koji sadrže neaktivne, ali specifične aminokiseline unutar roditeljskog proteina i moraju biti oslobođeni da bi pokazali potencijalne biološke aktivnosti kroz procese kao što je in vitro hidroliza peptidnih veza (proteolitičkim enzimima i kiselim ili alkalnim tretmanima), in vivo gastrointestinalno varenje i putem fermentacije mikroorganizama (Chalamaiah i sar., 2019). Ove metode hidrolize, međutim, oslobađaju peptide u grupu nekoliko drugih peptida i slobodnih aminokiselina, koje su zajednički poznati kao hidrolizati proteina.

U zavisnosti od sekvence aminokiselina, sastava, dužine i naelektrisanja, aktivni peptidi mogu pokazati impresivan niz bioloških svojstava. Ta svojstva su antioksidativna, antimikrobna, imunomodulatorna, antikancerogena, antihipertenzivna, antiinflamatorna, antilipidimska aktivnost sklona da utiče na kardiovaskularni, gastrointestinalni, imuni i endokrini sistem u ljudskom telu. Takođe, manje je verovatno da će se ovi peptidi akumulirati u telesnim tkivima i da neće izazvati ozbiljne neželjene efekte, što predstavlja bolju alternativu konvencionalnim lekovima u prevenciji i lečenju bolesti. Ali njihova relativno niska hemijska stabilnost, gorak ukus, podložnost gastrointestinalnom varenju ometa komercijalnu primenu u prehrambenom sektoru. Međutim, ovi izazovi se mogu prevazići izborom dobro dizajniranog matriksa za inkorporiranje i ciljano oslobađanje bioaktivnih peptida. Dakle, na osnovu mnoštva korisnih bioloških funkcionalnosti, čini se da je imperativ na tome da se iskoristi potencijal hidrolizata i peptida proteina hrane kao funkcionalnih molekula koji obećavaju unapređenje zdravlja ljudi.

Proteini iz različitih izvora kao što su mleko, meso, jaja, riba, kao i iz različitih biljnih izvora kao što su žitarice, uljarice, pseudožitarice i proteini dobijeni iz orašastih plodova (Daroit i Brandelli, 2021) se procenjuju i koriste za proizvodnju bioaktivnih peptida iz njihovih odgovarajućih hidrolizata.

Osim toga, agroindustrijski nusproizvodi bogati proteinima (Timilsena et al., 2016, Manzoor, Singh, i Gani, 2021) koji se obično odlažu kao otpad mogu biti jeftin izvor proizvodnje

bioaktivnih peptida. Stoga se čini ključnim pronaći potencijalne puteve za najbolju eksploataciju ovih izvora proteina u cilju dobijanja peptida sa bioaktivnom ulogom radi njihove komercijalne primenu u prehrambenim i farmaceutskim proizvodima.

Postoji veliki broj radova u literaturi koji opisuju upotrebu peptida dobijenih od proteina u različitim formulacijama hrane. Konzumacija prehrambenih proizvoda obogaćenih biološki aktivnim peptidima dokazano imaju benefite koji povoljno utiču na zdravlje ljudi. Kao primer, bioaktivni peptidi izolovani iz spiruline su pokazali potencijal za razvoj ekstrudirane grickalice sa većom antioksidativnom aktivnošću (Silva i sar., 2021). Peptidi kolagena iz morskih algi sa antioksidativnim potencijalom korišćeni su za poboljšanje osobina keksa za upotrebu u gerijatrijskoj ishrani (Kumar i sar., 2019). Takođe postoje i komercijalni mlečni napici obogaćeni bioaktivnim peptidima sa antihipertenzivnom aktivnošću (Sloan, 2019).

Hidrolizati proteina, dobijeni iz nusproizvoda karfiola, poseduju dokazano antioksidativno dejstvo (Zenezini Chiozzi et al. 2016) kao i inhibiciju enzima ACE (angiotenzin-konvertaza enzim) (Yang Xu sar., 2016). Takođe, dokazano je da oni regulišu potrošnju glukoze i sadržaj glikogena u HepG2 ćelijama što ukazuje na važnu ulogu u metabolizmu glukoze (Yang Xu i sar. 2017). Pored toga, nekoliko autora proučavalo je brojne antimikrobne peptide iz lišća, kao što su tionini, defenzini, peptidi bogati prolinom, proteini prenosiooci lipida i dr. (Padovan i sar., 2010; Wu i sar., 2011).

### **3.11. *In vitro* digestija kao model sistem za ispitivanje svarljivosti**

*Tokom gastrointestinalne digestije pod dejstvom enzima varenja dolazi do hidrolze proteina (Hernandez-Ledesma i sar., 2011). Pod dejstvom hlorovodonične kiseline (HCl) prisutnoj u želudcu dolazi do denaturacije proteina. Nizak pH aktivira pepsinogen i njegovu konverziju u aktivni oblik koji se naziva pepsin (Mohanti et al. 2016). Ovi enzimi se pojavljuju na površini epitelnih delija gde oslobađaju nekoliko peptida različite dužine. Neki od ovih peptida imaju direktnu funkciju u gastrointestinalnom traktu, dok se drugi apsorbuju putem sistemske cirkulacije kako bi došli do ciljnih organa i tkiva. Veliki broj radova opisao je simuliranu digestiju (in vitro) na različitim proteinima, poput proteina mleka (Lignitto i sar., 2010;), soje (Gonzalez-Montoia i sar., 2018), ili biljnih proteina (Pachaiappan i sar., 2018; Vaštag i sar.,*

2013; Čakarević i sar., 2021, Sedlar i sar, 2020), u cilju ispitivanja načina na koji gastrointestinalne proteaze posreduju u proteolitičkoj probavi proteina hrane i oslobađaju peptide koji pored nutritivne vrednosti obavljaju mnoge fiziološke i zdravstvene funkcije, tj. ispituju nastajanje bioaktivnih peptida.

In vitro modeli digestije se široko koriste za proučavanje strukturnih promena, svarljivosti i oslobađanja komponente hrane pod simuliranim gastrointestinalnim uslovima. Međutim, rezultati in vitro modela varenja često se razlikuju od onih koji se koriste u in vivo modelima zbog poteškoća u preciznosti simuliranja niza složenih fizičko-hemijskih i fizioloških procesa koji se dešavaju u ljudskom digestivnom traktu.

Nekoliko faktora, kao što su karakteristike uzorka, aktivnost enzima, jonski sastav, primenjena mehanička naprezanja i put varenja, imaju značajan uticaj na rezultate in vitro metode. Stoga, in vivo uslovi nikada ne mogu biti u potpunosti simulirani u in vitro uslovima. Rana studija Boisen i Egguma (1991) definisala je odnos između in vitro varenja i aktivnosti enzima. Prema tome, tehnika in vitro može biti dizajnirana tako da koristi specifične enzime bilo da se dobijaju maksimalne vrednosti svarljivosti ili tako da se meri početna brzina hidrolize. Najvažniji faktor u sistemu varenja in vitro predstavljaju karakteristike enzima. Nekoliko faktora, kao što su koncentracija, temperatura, pH, stabilnost, aktivatori, inhibitori, i vreme inkubacije, utiču na aktivnosti enzima (Boisen & Eggum, 1991). Izbor enzima i uslova inkubacije i potrebe za opremom takođe zavise od ciljeva studija (Boisen & Eggum, 1991). Metode sa jednim enzimom mogu biti korisne za predviđanje svarljivosti pojedinačnih hranljivih materija, npr. upotrebom pepsina, skroba upotrebom amilaze ili lipida pomoću upotreba lipaza (Boisen & Eggum, 1991).

U zavisnosti od složenosti modela, razlikuju se statički i dinamički model *in vitro* digestije. Kod statičkih modela digestija se simulira u želudcu i tankim crevima u dva uzastopna koraka, uz pomoć niza sudova sa mešanjem koji simuliraju skup biohemijskih procesa (temperaturu, enzime, pH i žučne soli) koji čine GIT. Njihova prednost se ogleda u lakoći izvođenja procesa i malih troškova, a nedostatak su varijacije u praćenju i primeni digestivnih parametara. Jeca Dinamički modeli predstavljaju sistem koji je složen i sastoji se od nekoliko međusobno povezanih delova, programiranih sa ciljem simulacije gastrointestinalnog trakta. Ovakvi modeli omogućavaju simulaciju dinamičkih aspekata varenja, kao što su transport obroka, konstantno

lučenje digestivnih sokova, promenljive koncentracije enzima i promene pH tokom vremena koje se dešavaju u uslovima in vivo (Čakarević Jelena, Doktorska disertacija, 2021).

### 3.11.1. Koraci *in vitro* digestije

Svaki korak in vitro metode, bilo statičkog ili dinamičkog modela, predstavlja fazu koja simulira deo digestivnog trakta čoveka. Tokom svakog koraka, supstrat se inkubira određeno vreme sa simuliranim digestivnim sokovima, sa konstantnim održavanjem pH i temperaturi 37 °C.

Razlikuju se tri faze simulacije GIT-a:

#### 1. Oralna faza

Ovo je prva faza digestije, gde se hrana razgrađuje mehanički žvakanjem, a pored toga i uz pomoć pljuvačke iz pljuvačne žlezde. Simulacija se odigrava uz pomoć soka koji simulira pljuvačku koja ima vrednosti pH 7 u prisustvu enzima  $\alpha$ -amilaza i trajanju oko 2 min. Ova faza je najkraća jer predstavlja usitnjavanje hrane čija svarljivost se nastavlja u želucu.

#### 2. Želudačna faza

Druga faza digestije koja se dešava u želudcu i u kojoj se vrši skladištenje, mešanje, mlevenje i pražnjenje. Želudačni sok (pH 2) se sastoji od hlorovodonične kiseline, enzima (pepsin i lipaza), elektrolita i sluzi. Simulacija želudačne faze traje od 1 do 2 sata (najduži proces) a dužina trajanja najviše zavisi od faktora kao što su sastav materije koja se unosi i njenog sadržaja makronutrijenata (masti, proteini i ugljeni hidrati) iz prethodne faze. Nakon ove faze sledi nastavak digestije u intestinalnoj fazi.

#### 3. Intestinalna faza

Intestinalna faza je glavna faza probave hrane i dešava se u tankom crevu nakon prolaska hrane kroz želudac. Kao i prethodne dve faze, simulacija intestinalne faze se vrši u prisutvu soka koji čine odgovarajuće soli pri vrednosti pH 7, u prisustvu pankreatina uz odgovarajuće mehaničko mešanje. Ova faza traje 1-2 sata, i predstavlja završetak in vitro digestije (Čakarević Jelena, Doktorska disertacija, 2021).

### 3.11.2. Digestivni enzimi

Digestivni enzimi u organizmu poseduju nekoliko osnovnih funkcija:

- Kao biološki katalizatori koji pokreću sam proces razgradnje hrane – digestivna funkcija;
- Podstiču bolju apsorpciju hranljivih materija iz smese koja se vari, sprečavaju konstipaciju i nastanak gasova I generalno imaju pozitivan uticaj na zdravlje organizma.

Postoje tri grupe digestivnih enzima: amilaze, proteaze i lipaze.

Amilaza je prisutna u ustima i želudcu i uglavnom služi za pretvaranje skroba u oligosaharide I monosaharidi (glukoza). Amilaza se rutinski koristi za *in vitro* modele varenja uzoraka hrane biljnog porekla. Njihova aktivnost zavisi od prisustva kofaktora metala (kalcijuma).

Proteaze su uglavnom prisutne u želucu (pepsin) i tankom crevu (tripsin i himotripsin) čija je uloga razlaganje proteina/peptida na manje peptide i amino kiseline. Pepsin postiže maksimalnu aktivnost na kiselim vrednostima pH na temperature između 35-42 °C. Pri vrednosti pH 6,5 I iznad je neaktivan, ali postoji mogućnost reaktivacije pri vraćanju vrednosti pH na 2. Optimalni radni pH tripsina je od oko 7,5 - 8,5 i optimalna radna temperatura oko 37 °C. U kiselim sredinama njegova aktivnost opada ali podešavanjem vrednosti pH nazad na 8, tripsin ponovo ispoljava svoju aktivnost.

Lipaze su prisutne u želucu (želudačna lipaza) i pankreasu (pankreasna lipaza), gde se apsorbuju na površinu emulgovanih lipida i pretvaraju triacilglicerole i diacilglicerole u monoacilglicerole i slobodne masne kiseline. Ovi produkti hidrolize lipida se rastvaraju unutar mešanih micela i vezikula koji ih transportuju do ćelija epitela kroz sluzokožu.

Obično se *in vitro* model zasniva na varenju skroba  $\alpha$ -amilazom, varenje lipida lipazom i/ili varenje proteina pomoću pepsina ili tripsina. Varenje u želudcu simulira se korišćenjem pepsina pri pH vrednosti oko 2. Prekursori proteaze – pepsinogeni – proizvedeni od glavne ćelije želuca, optimalno se aktiviraju pri pH između 1,8 i 3,2 u lumenu želuca (Jensen-Jarolim, 2006). Ovo ukazuje na to da svako povišenje pH može dovesti do ograničenja degradacije pepsinom (Jensen-Jarolim, 2006). Štaviše, na promene pH vrednosti u stomaku i crevima može uticati početni pH ili količina testiranog uzorka. Dakle, pH je takođe važan faktor za *in vitro* sisteme za varenje. Stoga je izbor karakteristika enzima kao npr sastav, koncentraciju i pH treba uzeti u obzir u skladu sa na karakteristike uzorka.

### **3.12. Biljni proteini i njihova višestruka industrijska primena**

U ishrani ljudi, postoji imperativ u upotrebi proteina kao makronutrijenata. Njihov nutritivni kvalitet značajno varira u zavisnosti od njihove svarljivosti, aminokiselinskog profila, biodostupnosti, načina dobijanja i stepena čistoće. Sa aspekta ishrane, integracija proteina iz različitih biljnih izvora može da obezbedi adekvatnu količinu esencijalnih aminokiselina za ispunjavanje zdravstvenih potreba ljudi. Upotreba proteina biljnog porekla je u poslednje vreme u žiži interesovanja zbog njihove višestruke primene kako u prehrambenim tako i u proizvodima drugih industrija a svakako i zbog njihove biorazgradive prirode. Usled njihovog fizičko-hemijskog i strukturnog svojstva, aminokiselinskog sastava i funkcionalnih osobina, proteini biljnog porekla od velikog su interesa za prehrambenu i prerađivačku industriju. U budućnosti, upotreba biljnih proteina će imati suštinski značaj, jer proteini životinjskog porekla ne mogu da zadovolje zahteve globalne populacije.

Primena proteinskih izolata i koncentrata je široko rasprostranjena. Generalno, mogu se definisati najbitniji razlozi za njihovu primenu: uloga u poboljšanju funkcionalnih osobina proizvoda, zatim biološka aktivnost i svakako multifunkcionalnost u pogledu nutritivne, funkcionalne i biološke aktivnosti. Najčešći primeri upotrebe izolata i koncentrata su kao dodaci ishrani, jestivi materijali za oblaganje, stabilizatori prehrambenih proizvoda, izvori bioaktivnih peptida, kao hidrogelovi, itd. Takođe imaju i primenu kao lepkovi, adhezivi i koagulanti.

Odlična funkcionalna svojstva dokazana su kod proteina iz sočiva, graška, faba pasulja i soje, kroz upotrebu kao emulgatora ili stabilizatora emulzija (Shi, Feng, Vang, i Adhikari, 2020).

Upotreba ovih proteina kao izvora bioaktivnih peptida ili proteinskih hidrolizata je takođe široko rasprostranjena. Peptidi su nosioci različitih bioaktivnih osobina kao što su antitumorska (Taniia, Reshma, Shanimol, Krishnan i Priia, 2020), hipoglikemijska (Nasri i sar., 2015), sposobnost snižavanja holesterola (Karami i Akbari-adergani, 2019), antitrombotički efekti (Lafarga, Ací'en-Fern´ Andez i Garsija Vakero, 2020), antihipertenzivna (He, Liu, i Ma, 2013), antimikrobna (Zhou i sar., 2020) i antioksidativna aktivnosti (Tonolo i sar., 2020).

Hidrogelovi su hidrofilna hemijski umrežena polimerna jedinjenja i imaju potencijal da apsorbuju tečnosti nekoliko puta veću od njihove težine. Hidrogelovi na bazi proteina i peptida spadaju u povoljnu kategoriju biomaterijala zbog svojih sposobnosti prilagođavanja na različite spoljašnje uslove kao što su pH, temperatura, svetlost, električno polje i prisustvo drugih molekula. Ovakve promene izazivaju hemijske reakcije u njihovoj strukturi i omogućavaju kontrolisano oslobađanje inkapsuliranih supstanci u spoljašnju sredinu. Hidrogelovi imaju višestruku primenu i koriste se u biosenzorici, kao jedinjenja sa zaštitnom ulogom, pri ćelijskoj inkapsulaciji, kod biomedicinskih implantanata, farmaceutskih proizvoda, u aditivima za hranu, kao super-apsorbenti, u kontaktnim sočivima i kod regulisanog oslobađanja lekova (Manoj Kumar i sar., 2022).

Proteini su nova generacija nosača u inkapsulaciji za kojima je izražena sve veća potreba u cilju njihove primene u industriji. U poređenju sa drugim nosačima (ugljeni hidrati, gume, vlakna, itd.) prednost proteina je u njihovoj visoko hranljivoj vrednosti, izvoru esencijalnih aminokiselina, ali i lakoj svarljivosti (Čakarević i sar., 2020). Međutim, sve je češća primena biljnih proteina kao nosača u procesu inkapsulacije, jer se ovi proteini smatraju ekonomičnim sa aspekta zaštite životne sredine. Biljni proteini u prirodnom obliku ili u obliku derivata se smatraju pogodnim nosačima u mikroinkapsulaciji, i predstavljaju dobru alternativu proteinima životinjskog porekla i sintetičkim polimerima (Čakarević Jelena, Doktorska disertacija, 2021).

Takođe, primena proteina za dobijanje jestivih ili biorazgradivih filmova je veoma rasprostranjena (Manoj Kumar i sar., 2022). Oni se koriste kao ambalaža za povećanje roka trajanja i stabilnost obloženog materijala, jer ograničavaju ulazak kiseonika i molekula vode u proizvod, kao i kretanje rastvorenih supstanci a nemaju uticaj na promene ukusa i teksture namirnice (Hassan et al., 2018). Nekoliko biljnih proteina, opisanih u literaturi, kao što su proteini soje, kukuruzni zein i pšenični gluten, koriste se za proizvodnju jestivih filmova u prehrambenoj industriji (Bourtoom, 2008; Sahraee, Milani, Regenštajn i Kafil, 2019).

Proteini deluju kao bioaktivna jedinjenja i čine osnovu imunog sistema. Dokazano je da su proteini važni u upravljanju kardiovaskularnim sistemom i u zaštiti tela od raznih bolesti. Biljni proteini pomažu u smanjenju holesterola, održavanju zdravlja kostiju, poboljšanju mišićne mase kod starijih ljudi i ispunjavanju zahteva sportista za proteinima (Gavrilova i sar., 2020; Georgei

sar., 2020). Dakle, proteini se mogu koristiti kao važan dodatak ljudskoj ishrani za održavanje zdravlja pojedinaca svih starosnih grupa.

Različiti biljni izvori su proučavani za upotrebu kao proteinski suplementi: mahunarke (leblebija, grašak, soja, lupina), žitarice (pšenica, pirinač, sirak, manje proso, kukuruz, ječam), pseudožitarice (amarant, heljda i kinoa), semenke (suncokret, bundeva, susam, laneno seme) i razno suvo voće (Almeida, Franco, & Mattar, 2020).

### **3.13. Ugradnja proteina u prehrambeni matriks**

Prehrambena industrija u poslednje vreme razvija nove proizvode koji su “zdraviji i raznovrsniji” kako bi zadovoljili sve veći interes potrošača za konzumiranje funkcionalnih proizvoda. Rastuća populacija pojedinaca koji brinu o svom zdravlju, zahteva razvoj novih proizvoda što predstavlja priliku za ugradnju prirodnih bioaktivnih jedinjenja. Osim unapređenja nutritivnih i organoleptičkih osobina proizvoda, na ovaj način dobijaju se proizvodi koji prvenstveno imaju blagotvorno dejstvo na ljudsko zdravlje.

Poslednjih nekoliko godina u literaturi je opisan veliki broj potencijalnih proizvoda obogaćenih prirodnim izvorima bioaktivnih jedinjenja, a to su: čajni keks (Kaderides i sar., 2020; Lucini i sar., 2020;), keks (Mahloko i sar., 2019), napolitanke (Rózyło i sar., 2019), krekeri (Nirmala i sar., 2018). Isto tako, sve je više podataka na temu obogaćenja prehrambenih proizvoda proteinima (u vidu koncentrata izolata i proteinskih brašna), uglavnom dobijenim od soje, ječma i pšenice. Međutim, zbog negativnih osobina ovih izvora (alergenost i/ili genetski modifikovan uzgoj) prehrambena industrija je u konstantnoj potražnji za alternativnim izvorima proteina. Kao jedan od primera je protein graška, koji u obliku koncentrata ili izolata može biti alternativa zbog svog nutritivnog kvaliteta i sposobnosti da obezbedi poželjna senzorna svojstva poput strukture, teksture, ukusa i boje za formulisanje prehrambenih proizvoda (O'Sullivan, Murrai, Flinn, & Norton, 2014).

Prehrambeni proizvodi u formi kolačića i krekeri smatraju se jedim od najpopularnijih peciva i veliku pažnju dobijaju zbog njihove niske cene proizvodnje, praktičnosti, dugog veka trajanja usled niskog sadržaja vode, sastava hranljivih materija. Pre svega, krekeri se prave od brašna pšenice, raži i ječma i poznati su po svojim specifičnim karakteristikama kao što su slani, suvi, tanki i hrskavi proizvodi, pečeni od nezaslađenog i beskvasnog testa (Su, Zhang, Vang i Li,



2020). Još jedan važan indikator kvaliteta krekeri je narastanje, koja se definiše kao odnos razlike krekeri pre i posle pečenja do debljine testa za kreker (Ksu i sar., 2020).

U poslednje vreme funkcionalni krekeri imaju sve veću popularnost (Nicole, Nichelle, Elizabeth i Juliarti, 2021). Postoji brojna literatura o razvoju funkcionalnih krekeri obogaćenih različitim komponentama poput: ekstrakta prokljalog sočiva (Polat, Capar, Inanir, Ekici i & Yalcin, 2020), celog zrna od heljde (Sedej i sar., 2011), brašna lišća masline, pastom tempeha (fermentisana soja) (Tan Zhi Hui Nicole i sar., 2021), ostacima hibiskusa (Ahmed i Abozed, 2015) i bezglutenski krekeri od kaktusovog brašna (Dick i sar., 2020).

Dodavanje proteina u keksiće na bazi pšenice dovelo je do povećanja koncentracije esencijalnih aminokiselina (Ahmed, Ashraf, Avadelkareem, Alam, & Mustafa, 2019), uticalo je na boju (Gani et al., 2015; Nogueira, Aguiar, Capriles, & Steel, 2021) poboljšalo aromu, ukus i rok trajanja (Markues, Sao Jose, Silva, & Silva, 2016; Tsikritzi, Moinihan, Gosni, Alen i Metven, 2014). Implementacija inkapsulata soka cvekle na proteinskom izolatu tikve u keks (Čakarević i sar., 2020) dovelo je do povećanja sadržaja kupnih fenola i betalaina, a nakon *in vitro* digestije hidrolizati su pokazali značajnu antioksidativnu, antihipertenzivnu i antidiabetičku aktivnost, čime je dokazano da takva vrsta proizvoda poseduje potencijale benefite po ljudsko zdravlje. Pokazalo da dodavanje proteina surutke utiče na svarljivost prisutnih proteina i skroba u pečenom proizvodu (Cattaneo, Masotti, Silveti, Hidalgo i De Noni, 2019). Generalno, dodavanje proteina u krekeri, keksiće na bazi pšeničnog brašna, može da modifikuje strukturu finalnog proizvoda. Ovo se dešava jer mreža proteina unapređuje (poboljšava) mrežu glutena tokom formiranja testa., što može da dovede do unapređenja viskoelastičnosti testa.

Sa druge strane, usled netolerancije pojedinih osoba na gluten, neka istraživanja su fokusirana na razvijanju bezglutenskih formulacija krekeri ili kolačića. Za njihovu izradu uglavnom se koriste brašno leblebije, zelenog, žutog i crvenog sočiva, graška i soje (Han, Janz, i Gerlat, 2010, Nammakuna, Barringer, i Ratantriwong, 2015).

Neki autori koristili su funkcionalne sastojke kao što su brašno konoplje (0, 15, 45 i 60 g) i listovi zelenog čaja bez kofeina (0–8 g) kao dodatak pirinčanom brašnu za pripremu krekeri. Rezultati su pokazali da je brašno konoplje povećalo nutritivne kvalitete kao što su sadržaj proteina, vlakana, minerale i esencijalne masne kiseline a dodatak lišća zelenog čaja povećalo je

antioksidativna svojstva krekeri (Radočaj, Dimić, i Tsao, 2014). Nammakuna i saradnici (2015) su koristili proteinske izolate soje, graška i surutke za pripremu bezglutenskih krekeri na bazi mešavina pirinčanog brašna i preželatinizovanog skroba tapioke. Dodavanje proteinskih izolata u mešavine brašna imaju uticaj na tvrdoću krekeri u zavisnosti od specifičnog dodatka proteina (Nammakuna, Bar ringer, & Ratantrivong, 2015).

Međutim, bezglutenski krekeri su još uvek neistraženo polje. Samo nekoliko brašna bez glutena je korišćeno za njihovu proizvodnju, a do sada je samo nekoliko studija u literaturi fokusirano na poboljšanje nutritivnih vrednosti, senzornih svojstava i teksture dobijenih krekeri. Štaviše, malo se zna o interakciji između supstituenata i osnove brašna, kao i unutrašnje interakcije između skroba, proteina, vode i drugih.

U dosadašnjem istraživanju upotreba proteina lišća kao funkcionalnog sastojka prehrambenih proizvoda nije pronađena u literaturi.

## 4. Materijal i metode

### 4.1. Materijali

#### 4.1.1. Sirovine

Lišće karfiola, brokolija, kupusa i cvekla koje je korišćeno u ovoj doktorskoj disertaciji vodi poreklo sa više lokaliteta. Sakupljano je nakon branja povrća, sa poljoprivrednih gazdinstava koji su locirani u jugozapadnom delu Srbije, u centralnom i zapadnom delu Vojvodine. Nakon prikupljanja i transporta, lišće je oprano i čuvano u zamrzivaču (-18°C).

#### 4.1.2. Hemikalije i reagensi

Svi reagensi i hemikalije korišćeni u eksperimentalnom radu bili su analitičkog ili višeg stepena čistoće. 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal, Folin-Ciocalteu reagens, trihlorsirćetna kiselina (TCA) kalijumpersulfat i Dalton Mark VII, Coomassie Brilliant Blue G-250 proizvodi su Sigma Chemical Company (Sigma Aldrich, SAD).

Za ispitivanja su korišćeni komercijalno dostupni tečni ili čvrsti enzimski preparati:  $\alpha$ -amilaza poreklom iz pankreasa svinje (deklarisane aktivnosti 5 U/mg), pankreatin poreklom iz pankreasa svinje (deklarisane aktivnosti 4\*USP), Viscozyme<sup>®</sup>L, multi-enzimski kompleks koji sadrži arbanazu,  $\beta$ -glukanazu, celulazu, hemicelulazu i ksilanazu, dobijen iz *Aspergillus aculeatus-a* (deklarisane aktivnost od 100 FBG/g) pribavljeni od proizvođača Sigma Chemical Company (Sigma Aldrich, SAD); pepsin iz želudca svinje (deklarisane jačine 0,7 FIP U/mg) od proizvođača AppliChem (Darmstadt, Nemačka), pektinaza Vinoxyme<sup>®</sup> Process Novozymes (deklarisane aktivnosti 7,8 U/mL).

## **4.2. Metode**

### **4.2.1. Hemijski sastav**

#### **4.2.1.1. Hemijski sastav izolovanih proteina lišća**

Pri određivanju hemijskog sastava proteina lišća korišćene su AOAC (1990) metode su korišćene za određivanje vlage, sadržaja proteina (izračunato sa faktorom konverzije azota od 6,25) masti i pepela izolovanih proteina lišća. Sadržaj ukupnih ugljenih hidrata je izračunat razlikom (100 - sadržaj vlage, proteina, masti i pepela). Rezultati su izraženi u g/100 g proteina lista.

#### **4.2.1.2. Hemijski sastav lišća**

Osnovni hemijski sastav lišća karfiola i brokolija (sadržaj sirovih proteina, masti, pepela, vlage) određen je primenom standardnih AOAC metoda (AOAC, 2000). Sadržaj sirovih proteina određen je metodom po Kjeldahlu (AOAC 920.87) pri čemu je korišćen faktor konverzije  $n=6,25$ , sadržaj masti po Soxlet-u (AOAC 922.06), sadržaj vlage metodom AOAC 925.09 i sadržaj pepela metodom AOAC 923.03. Sadržaj ukupnih ugljenih hidrata određen je računski na osnovu izraza  $100\% - (\% \text{ vlage} + \% \text{ proteina} + \% \text{ masti} + \% \text{ pepela})$  (FSAI, 2010).

### **4.2.2. Postupci dobijanja proteina lišća – alkalnom ekstrakcijom, primenom ultrazvučnog predtretmana, primenom enzimskog pretretmana, i “scale - up” procesom**

#### **4.2.2.1. Dobijanje proteina lišća karfiola, brokolija, kupusa i cvekle alkalnom ekstrakcijom**

Procedura se izvodi prema metodi od strane Xu i sar., (2017), sa izvesnim modifikacijama. 200 grama iseckanog lišća homogenizovano je štapnim mikserom sa destilovanom vodom u odnosu tečno/čvrsto 7ml/1g. Nakon alkalne ekstrakcije rastvorenih proteina na pH 10, smeša je profiltrirana, a pH sakupljenog supernatanta podešena je na pH 4, pomoću 1M HCl (izoelektrična precipitacija). Nakon centrifugiranja (Sorvall® RC - 5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, USA) na 10 000 rpm i 4°C za 20 min, talog (istaloženi protein) je osušen na sobnoj

temperaturi i samleven. Sadržaj proteina lišća karfiola, brokolija, cvekle i kupusa određen je metodom po Kjeldalu, koristeći 6,25 kao konverzioni faktor.

Ekstrakcioni proteinski prinos izračunat je prema formuli (1) (Xu i sar., 2017):

$$\text{Ekstrakcioni proteinski prinos (\%)} = \frac{W \cdot S1}{M \cdot S2} \quad (1)$$

W – masa dobijenog proteinskog koncentrata

S1- koncentracija proteina u proteinu lista,

S2 – koncentracija protina u svežem otpadnom lišću

M – masa svežeg otpadnog lišća koja se koristi u eksperimentu.

#### **4.2.2.2. Dobijanje proteina lišća karfiola, brokolija, kupusa i cvekle primenom ultrazvučnog predtretmana**

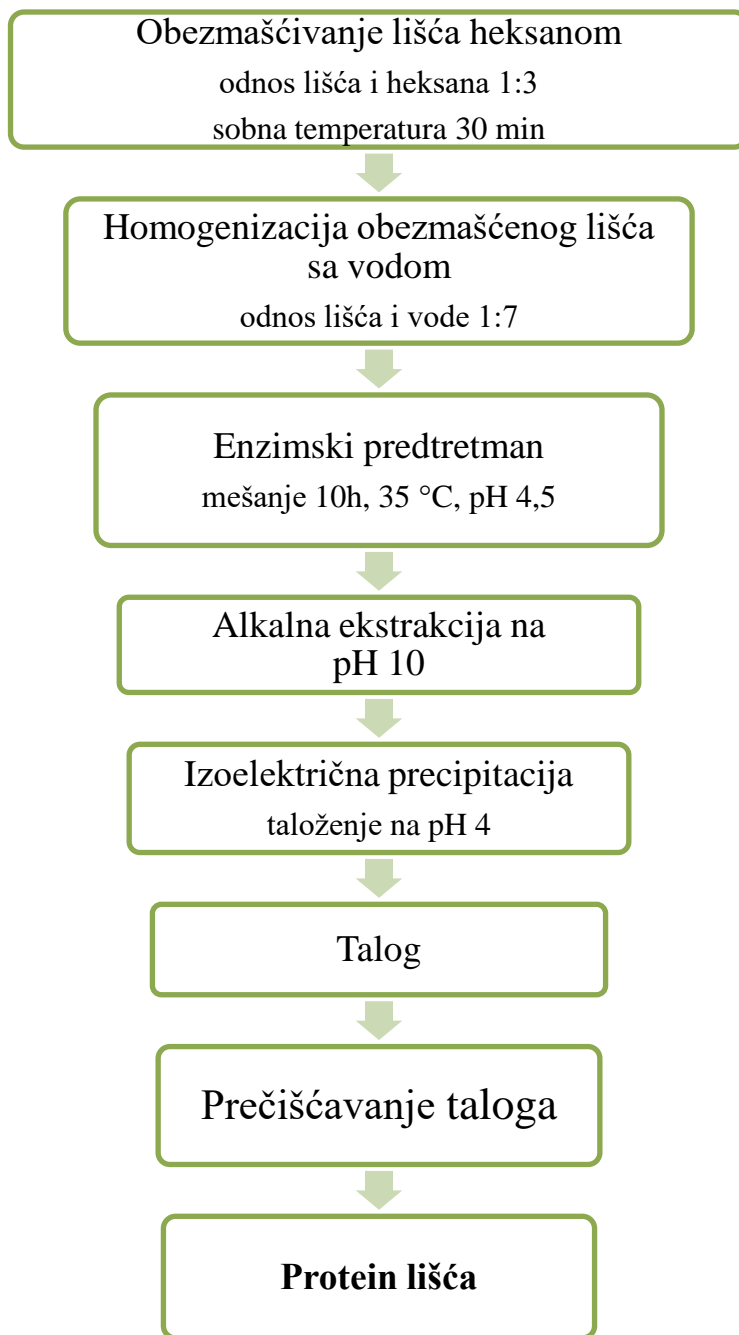
Procedura se izvodi prema metodi od Xu i sar., (2017), sa izvesnim modifikacijama. 100 grama iseckanog lišća homogenizovano je štapnim mikserom sa destilovanom vodom u odnosu tečno/čvrsto 7ml/1g. Nakon toga, pomoću 1 M NaOH pH smeše je podšen na odgovarajuću vrednost (pH 10-11), a zatim je smeša premeštena u ultrazvučnom kupatilo (UZ 4P, 30 kHz/500 ISKRA) za ekstrakciju proteina tokom 30 minuta. Nakon toga, smeša je filtrirana kroz tri sloja gaze da bi se uklonila sirova vlakna i nerastvorljivi protein, a pH sakupljenog supernatanta podešena je na pH 4, pomoću 1M HCl (izoelektrična precipitacija). Nakon centrifugiranja (Sorvall® RC - 5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, USA) na 10 000 rpm i 4°C za 20 min, talog (istaloženi protein) je osušen na sobnoj temperature i samleven. Sadržaj proteina lišća karfiola, brokolija, cvekle i kupusa određen je metodom po Kjeldalu, koristeći 6,25 kao konverzioni faktor.

Ekstrakcioni prinos proteina izračunat je prema formuli (1) (Xu i sar., 2017).

#### **4.2.2.3. Dobijanje proteina lišća karfiola i brokolija primenom enzimskog predtretmana**

Proces dobijanja proteina lišća počinje odmaščivanjem lišća heksanom, koji smanjuje prisustvo nepolarnih jedinjenja i dodatno povećava sadržaj proteina. Odmaščivanje heksanom vrši se u odnosu 1:3 (v/v).

U ovom radu ekstrakcija je izvršena prema Xu i sar., (2017), (Slika 12) sa određenim izmenama. Usitnjeno lišće, mase 200 g, prethodno prečišćeno heksanom, potpoljeno je u destilovanu vodu u odnosu 7:1 (7 ml destilovane vode : 1 g čvrstog uzorka), nakon čega je celokupna smeša homogenizovana pomoću štapnog miksera. Homogenizovanoj smeši je pH podešen na vrednost 4.5 pomoću 1M HCl, temperatura je podešena na 35°C, a mešanje je obezbeđeno pomoću propellerske mešalice čime su zadovoljeni optimalni uslovi za dejstvo enzima. Uslovi za dejstvo enzima preuzeti su od strane Nguyen Thai Huynh i sar. 2014. Nakon podešavanja uslova u smešu je dodat enzimski kompleks koji sadrži i preparat Vinozyme<sup>®</sup> i Viscozyme<sup>®</sup>L. Enzimski kompleks je primenjen u tri različite koncentracije E/S odnosa 0,2%, 2,5%, 4,8%. Uporedo, sa svakom koncentracijom enzimskog kompleksa, na isti način pripremljen je i kontrolni uzorak (bez dodatka enzima). Ispitivani uzorak (smeša lišća i vode sa dodatkom određene koncentracije enzimskog kompleksa) i kontrolni uzorak (bez dodatog enzima) su ostavljeni, na navedenim uslovima, da se mešaju 10 h, pri čemu je došlo do razgradnje lišća. Nakon mešanja usledila je alkalna ekstrakcija rastvorljivih proteina, odnosno pH smeše je podešen između 10–11 pomoću 1M NaOH. Nakon 30 min smeša je filtrirana, a pH sakupljenog supernatanta je podešen na pH 4 pomoću 1M HCl (izoelektrična precipitacija). Sledeći korak je centrifugisanje (Sorvall<sup>®</sup> RC - 5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, USA), pri 10 000 o/min i 4 °C tokom 20 min, nakon čega je dobijen talog sa proteinima, koji je prečišćen, osušen i sprашen.



*Slika 12. Šematski prikaz dobijanja proteina lišča primenom enzimskog predtretmana*

Alikvoti iz različitih faza eksperimenta (Slika 13) su uzorkovani radi monitoringa koncentracije rastvorenih proteina.



Slika 13. Šematski prikaz faza eksperimenta

Sadržaj proteina u sirovom lišću se može izračunati pomoću sledeće formule (2) :

$$\text{Sadržaj proteina } \left(\frac{mg}{g}\right) = C \times \frac{V_s}{m} \quad (2)$$

gde je:

- C – koncentracija rastvorljivih proteina određene metodom Bradford-u (Bradford, 1976),  $\frac{mg}{ml}$
- $V_s$  – zapremina supernatanta,  $ml$
- m – masa lišća,  $g$

Ekstrakcioni proteinski prinos računa se prema sledećoj formuli (3):

$$\text{Ekstrakcioni proteinski prinos}(\%) = \frac{\text{Sadržaj ekstrahovanih proteina } \left(\frac{mg}{g}\right)}{\text{Sadržaj proteina u lišću } \left(\frac{mg}{g}\right)} \quad (3)$$

#### 4.2.2.4. Dobijanje proteina lišća brokolija za ugradnju u prehrambeni matriks (kreker)

Dobijanje proteina lišća brokolija za ugradnju u prehrambeni matriks, u ovom slučaju kreker, izvedeno je pri *scale – up* procesu. Podizanje procesa izolovanja proteina izvedeno je u ekstraktoru zapremine 45 l opremljenom regulatorom temperature i mehaničkom mešalicom. Prelazak na eksperiment sa uvećanim razmerama na pilot postrojenju, moguće je ostvariti jer je mehanička mešlica omogućavala rukovanje viskoznijom suspenzijom u poređenju sa magnetnom mešalicom u laboratorijskoj čaši. U pilot scale procesu, 1,5kg suvog lišća pomešano je sa 25l vode da bi se dobila suspenzija lišća (16,6%) iz koje se ekstrahuju proteini. Smeši je podešen pH na 10, sa 10M NaOH, ekstrakcija je trajala 30 min. Nakon ekstrakcije suspenzija je podvrgnuta filtraciji, da bi se odvojio filtrat bogat proteinima. Filtrat je prebačen u ekstraktor gde je pH



vrednost podešena na pH 4, sa dodatkom 10 M HCl, radi taloženja proteina. Nakon toga sadržaj je dekantovan i centrifugiran. Dobijeni talog je osušen, samleven i poslat na dalju analizu.

*Pilot postrojenje za ekstrakciju proteina projektovala je, izradila i donirala kompanija "EVROBROD" d.o.o. Zrenjanin*

#### **4.2.2.5. Ugradnja proteina lišća brokolija u prehrambeni matriks**

Dobijeni protein lišća brokolija ugrađen je u dve vrste prehrambenog matriksa, glutenski (sa integralnim pšeničnim brašnom) i bezglutenski kreker (sa brašnom leblebije). Formulacija za testo glutenskih krekeri sadrži sledeće: integralno pšenično brašno (50 g), šećer (1 g), biljna mast (7,5 g), natrijum hlorid (0,75 g), natrijum hidrogenkarbonat (0,50 g), i voda do sadržaja vlage od 25%, a bezglutenskih kekeri: brašno leblebije (50g), ), šećer (1 g), biljna mast (7,5 g), natrijum hlorid (0,75 g), natrijum hidrogenkarbonat (0,50 g), i voda do sadržaja vlage od 25%. U testu je izvršena supstitucija brašna sa proteinom lišća brokolija u sadržaju od 10% i 15%. Prvo je pripremana praškasta faza, mešanjem suvih sastojaka, zatim priprema testa po dvofaznom postupku obuhvatala je: mešanje biljne masti sa šećerom u prahu, destilovane vode i mešanje smeše do dobijanja homogene mase bez vidljivih grudvica, postepeno dodavanje praškastih komponenti uz mešanje u trajanju od jednog minuta. Obrada testa vršena je na laminatoru (Mignon, Rimini, Italy) postepenim istanjivanjem testa propuštanjem između dva valjka, čiji se zazor postepeno smanjuje (do zazora laminatora 2,5). Oblikovanje testa izvršeno je utiskivanjem odgovarajućeg kalupa (Ø 45 mm)- 5 kom, ostatak manjim kalupom. Pečenje oblikovanog testa izvršeno je u etažnoj peći (MIWE Gusto CS, Arnstein, Germany) na temperaturi 190 °C u trajanju od 10 minuta, a hlađenje ispečenog keksa je u uslovima radne prostorije u trajanju od 60 minuta nakon čega se keks pakuje u polipropilensku ambalažu i čuva za dalja ispitivanja.

Uzorci su definisani kao K1 (kontrola sa integralnim pšeničnim brašnom), PP10 (krekeri sa integralnim pšeničnim brašnom sa 10% proteina lišća), PP15 (krekeri sa integralnim pšeničnim brašnom sa 15%), K2 (kontrola sa brašnom leblebije), LP10 (krekeri sa brašnom leblebije sa 10% proteina lišća), LP15 (krekeri sa brašnom leblebije sa 15% proteina lišća).

#### **4.2.2.6. Izolovanje i frakcionisanje proteina lišća prema Ozbornu**

Izolovanje proteina prema Ozbornu (metodi) izvodi se prema metodi Agboola i sar., (2005). Proteini su ekstrahovani iz svežeg otpadnog lišća karfiola, brokolija, kupusa i cvekle prema njihovoj rastvorljivosti na sobnoj temperature (25°C) u vodi, 5% NaCl, 0.1 M NaOH and 70% etanolu. Dakle, 10 g svežeg otpadnog lišća homogenizovano je sa 40 ml destilovane vode i konstantno je mešana tokom 1h. Nakon ekstrakcije, sledi centrifugiranje smeše na 3000 rpm tokom 10 minuta da bi se sakupio supernatant koji sadrži albuminsku frakciju. Takođe, ostatak (talog) iz ovog koraka je nakon toga ekstrahovan sa 40 ml, 5% NaCl da bi se sakupila globulinska frakcija. Ostatak nakon ekstrakcije globulinske frakcije dalje je ekstrahovan sa 40 ml 0.1 M NaOH tokom 1h da bi se sakupila glutelinska frakcija, i ostatak nakon glutelinske frakcije ekstrahovan je sa 40 ml 70% etanola da bi se sakupila prolaminska frakcija. Procedura je identično ista za svaku vrstu otpadnog svežeg lišća. Nakon ekstrakcije sadržaj rastvorenih proteina u supernatantu određen je metodom po Lowry. Sadržaj proteina u svežem lišću izračunat je na osnovu Ozbornove metode, računajući sumu svih proteinskih frakcija koje su prisutne u inicijalnom materijalu.

### **4.3. Hemijske analize u karakterizaciji proteinskih izolata dobijenih enzimskim predretmanom, i prehrambenog matriksa**

#### **4.3.1. Aminokiselinski sastav**

Analiza aminokiselinskog sastava u proteinskim izolatima izvedena je jonoizmjenjivačkom hromatografijom sa amino analizatorom Biochrom 30+ (Biochrom, Cambridge, UK), prema metodi opisanoj od strane Spackman i sar. (1958). Tehnika se zasniva na razdvajanju aminokiselina primenom hromatografije sa izmenjivanjem katjona, praćene bojenom reakcijom ninhidrina i fotometrijskom detekcijom na 570 nm i 440 nm (za prolin). Pre analize, uzorci su hidrolizovani u 6M HCl na 110 °C tokom 24 h. Nakon hidrolize, uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu i rastvoreni u 25 mL pufera (vrednosti pH 2,2) za punjenje analizatora. Dobijena retencionna vremena aminokiselina su identifikovana sa retencionim vremenima standarda aminokiselina. Rezultati su izraženi kao g aminokiseline na 100 g proteinskog izolata (Tomičić i sar., 2020).

### **4.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola**

Sadržaj ukupnih fenola u alikvotima je određen spektrofotometrijski pomoću Folin-Coicalteu-ovog reagensa, metodom koju je opisao Singleton i sar., (1999). Uzorak (0.1 ml) je razblažen destilovanom vodom (7.9 ml), dok je kontrolni uzorak sadržao samo 8 ml vode, bez uzorka, a potom je dodat Folin-Coicalteu-ov reagens (0.5 ml) i 20% rastvor natrijum karbonata,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , (1.5 ml). Ovako pripremljeni uzorci ostavljeni su 1 h na tamnom, nakon čega je absorbanca merena na 750 nm (T80 UV-Vis Spectrophotometer; PG Instruments, Lutterworth, UK) (Singleton, 1999).

## **4.4. Karakterizacija proteinskih izolata dobijenih alkalnom ekstrakcijom, primenom ultrazvučnog pretretmana i primenom enzimskog pretretmana i matriksa**

### **4.4.1. Elektroforeza (SDS-PAGE)**

Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (PAGE) u prisustvu anjonskog deterdženta, natrijum dodecil sulfata (SDS), pokazala se kao korisna metoda za odvajanje proteina i za određivanje njihove molekularne mase. Proteinske podjedinice uzorka proteinskih koncentrata razdvojene su metodom koju je opisao Laemmli. Sistem gela se sastoji od dva gela, 4% (v/v) akrilamidnog gela za slaganje (gel za uzorke) i 10% (v/v) gela za odvajanje akrilamida. Uzorci (1 mg/mL) su pripremljeni rastvaranjem u Tris/Gli puferu (pH 6,8) koji sadrži 20 g/L SDS i 50 g/L 2-merkaptetoetanol. Nakon pripreme gelova i uzoraka, aparat za elektroforezu (Multi Drive KSL, Pharmacia, Upsala, Švedska) je pušten u rad na 50 mA, na 25 °C, sve dok obojeni tragač dođe do dna svakog gela. Kada je elektroforeza završena, Gelovi su bojeni u zavisnosti od vrste i koncentracije uzoraka na dva načina: Gelovi su obojeni sa 0,2% (v/v) Coomassie brilliant blue R-250 u 10% (v/v) sirćetnoj kiselini tokom 30 minuta: 50% (v/v) metanolu, a nakon toga su obezbojavani tokom 48 h sa 10% (v/v) sirćetne kiseline koja sadrži 40% (v/v) metanola.

### **4.4.2. Furije transformišuća infracrvena (FTIR) spektroskopija**

Uzorci su pripremani za FTIR snimanje tako što su pakovani u tablete sa KBr, u masenom odnosu 1:1. Svi uzorci su snimani na sobnoj temperaturi na uređaju Nicolet IS10 FTIR spektrofotometar (Thermo Fisher Scientific, MA, SAD). Spektri su snimani u opsegu 4000- 500

cm<sup>-1</sup> , pri rezoluciji od 4 cm<sup>-1</sup> . Pre snimanja svakog uzorka snimljena je slepa proba. Softver Omnic 8.1. (Thermo Fisher Scientific, MA, SAD) je korišćen za prikupljanje i obradu FTIR spektara. Rezultati snimanja prikazani su grafički.

#### **4.5. Funkcionalna svojstva proteina lišća dobijenih – alkalnom ekstrakcijom, primenom ultrazvučnog pretretmana i primenom enzimskog pretretmana**

##### **4.5.1. Određivanje rastvorljivosti proteina**

Rastvorljivost proteina određena je metodom koju su definisali Popović i sar., (2013). Rastvorljivost je određena (drugacije) pri različitim pH vrednostima (pH 2 – pH 10). Suspenzija proteina lista je pripremljena u Eppendorf epruvetama, dodavanjem 1 mL puferskog rastvora u 10 mg praha proteinskog koncentrata. Nakon toga, pripremljeni uzorci su mešani u Thermo ShakerTS-100C (BioSan, Letonija) 1 h, sa 900 o/min, na 25 °C. Rastvori su centrifugirani na 14 500 rpm tokom 10 min (Eppendorf Mini-spin plus, Eppendorf AG., Hamburg, Nemačka). Supernatant je dekantovan i rastvorljivi proteini iz supernatanta su određeni metodom po Lowry.

##### **4.5.2. Kapacitet vezivanje vode i ulja**

Kapacitet vezivanja vode i ulja određivani su prema metodi Rodsamran i Sothornvit (2018). 100 mg proteina lista odmereno je u prethodno izmerene Ependorf epruvete, a zatim je dodato 1 ml biljnog ulja/vode. Nakon toga, smeše u Eppendorf kivetama su inkubirane u Thermo Shaker TS-100C Biosan na sobnoj temperaturi tokom 30 minuta, a zatim centrifugirane na 4000 rpm tokom 20 minuta (Ependorf Mini spin plus) na sobnoj temperaturi. Okretanjem epruveta naopako ulje/voda je uklonjeno, a epruvete sa uzorcima su izmerene. Kivetama sa uzorcima je nakon toga izmerena masa i kapacitet vezivanja ulja i vode je izražen kao g ulja ili vode/g proteina lista.

##### **4.5.3. Kapacitet i stabilnost formiranja pene**

Kapacitet i stabilnost pene određivani su prema metodi Popović i sar., (2013). Rastvori za određivanje ova dva parametra pripremljeni su u koncentraciji od 10 mg/ml. 0.5g uzorka proteina lista pomešani su sa 50 ml 0.1 M glicinskog pufera pH 10 u toku 30 minuta. Nakon toga, rastvori su homogenizovani pomoću Ultra-Turrax T25 na 5.000 rpm tokom 2 min. Tako pripremljeni, homogenizovani rastvor, prenešeni su u granduisane cilindre od 50 ml, a zapremina rastvora je zabeležena 0 min ( $V_0$ ) i nakon 1, 10, 30, 60, 90 min ( $V_1$ ). . Kapacitet pene (FC) je

izražen u procentima kao udeo zapremine pene u ukupnoj zapremini (x100) (4). Stabilnost pene (FS) izražena je kao vrednost FC u različitim vremenskim intervalima (1, 10, 30, 60 i 90 min).

$$FC = \frac{V_t - V_{p0}}{V_t} * 100 \quad (4)$$

Gde su:  $V_{p,0}$  visina pene u 0 min i  $V_t$  – ukupna zapremina pene.

#### **4.5.4. Svojstva emulgovanja – stabilnost emulzija**

Priprema i karakterizacija emulzija rađeni su prema metodi Bučko i sar., (2015). Rastvori sva četiri proteina lista su pripremljeni u koncentraciji od 10 mg/ml u glicinskom puferu pH 10. Emulzije ulja u vodi su pripremljene dispergovanjem 4,5 ml suncokretovog ulja u 25,5 ml rastvora proteina (15%) (kontinuirana faza) korišćenjem Ultraturaks Te-25 (Janke & Kunkel, Germanu) homogenizatora na 15000 o/min tokom 10 min na 25 °C.

Prema ovoj metodi, kriming test se koristi za određivanje stabilnosti emulzija. Odmah nakon pripreme, emulzije su prebačene u 10 ml graduirane cilindre od stakla. Za određivanje kriming indeksa emulzije su prebačene u granduisane cilindre i ostavljene 14 dana na sobnoj temperaturi, gde je emulzijama dodata kap natrijum-azida kao antimikrobnog sredstva (konzervansa). Tokom vremena emulzije su se razdvojile na sloj razdvojene u emulzionoj kreme (gornji sloj) i sloj seruma (donji sloj), tokom vremena. KI – kriming indeks (5), je izražen u procentima kao:

$$KI = \frac{V_s}{V_e} * 100 \quad (5)$$

gde je  $V_s$  zapremina sloja seruma, a  $V_e$  zapremina emulzije.

### **4.6. Ispitivanje svarljivosti proteina i bioaktivnosti dobijenih hidrolizata proteina llišća i prehranbenog matriksa**

#### **4.6.1. *In vitro* digestija**

*In vitro* digestija proteina lista sprovedena je adaptacijom metode koju su objasnili Vaštag i sar., (2013) koristeći kombinaciju dve gastrointestinalne proteaze, pepsina i pankreatina, u cilju simulacije čovekovog gastrointestinalnog okruženja. 2,5% suspenzije koncentrata proteina su pripremljene (2,5g/100cm<sup>3</sup>) u staklenom reaktoru i inkubirane na 37°C. Zatim je pH vrednost podešena na 2,5-3,0 i dodat pepsin u E/S odnosu 1/25. Ova reakcija je simulirala stomačnu

(želudačnu) sredinu i izvedena je u periodu od 1h. Jedan sat nakon reakcije, pH rastvora je podešen na pH 7,5-8,0 i dodat je pankreatin u E/S odnosu 1/25 i intestinalna digestija je sprovedena naredna 2 sata. Ukupno, proces varenja se odvijao u periodu od 3 sata. Da bi se ova reakcija zaustavila, smeša je zagrevana na 100°C tokom 5 minuta i centrifugirana korišćenjem Eppendorf Mini spin plus na 14.500 rpm tokom 10 minuta na sobnoj temperaturi, a supernatanti su sakupljeni i korišćeni za dalju analizu. Tokom digestije alikvoti su uzimani na 0 min, a posle 10, 20, 30, 60, 70, 90, 120, 150 i 180 min reakcije. Zagrevani su na 100°C tokom 5 minuta i centrifugirani korišćenjem Eppendorf Mini spin plus na 14.500 rpm tokom 10 minuta na sobnoj temperaturi, a sakupljeni supernatanti su korišćeni za dalju analizu.

#### **4.6.2. *In vitro* digestija prehrambenog matriksa (krejera)**

U slučaju krejera *in vitro* digestija je izvedena iz metode opisane prema Minekus i sar., (2014), uz pojedine izmene. Metoda je zasnovana na tri faze koje simuliraju uslove u ustima, želucu i crevu. Simulirani sokovi pljuvačke (SSP), želuca (SSŽ) i creva (SSC) pripremljeni su prema recepturi koja je prikazana u Tabeli 3. Samlevni uzorak se pomeša sa 5 mL vode i 4 mL SSP i 25 µL 0,3 M CaCl<sub>2</sub>. Potom, vrednost pH rastvora se podesi na pH 7 nakon čega se doda 0,5 mL enzima α-amilaze i rastvor dopuni sa destilovanom vodom do 10 mL. Oralna faza izvodi se na 37 °C i traje 2 min, što simulira proces žvakanja. Želudačna faza započinje dodavanjem 8 mL SSŽ i 5 µL 0,3M CaCl<sub>2</sub> i podešavanjem vrednosti pH na 3. Nakon toga, dodaje se 0,04 g enzima pepsina i dopuni se zapremina rastvora sa destilovanom vodom do 20 mL. Ova faza se inkubira na 37 °C i traje 120 min. Na kraju faze uzima se alikvot koji se centrifugira na 10 000 rpm 5 min, dobijeni supernatant se čuva i koristi za dalje analize. Potom započinje intestinalna faza tako što se u 11 mL SSC i 40 µL 0,3M CaCl<sub>2</sub>. Vrednost pH rastvora podešava se na 7. Zatim se dodaje 0,04 g enzima pankreatina i dopunjava se zapremina rastvora sa destilovanom vodom do 40 mL. Intestinalna faza se inkubira na 37 °C i traje 120 min. Nakon toga, uzorci se centrifugiraju 10 000 rpm na 10 min. Dobijeni supernatant se čuva u zamrzivaču i koristi za dalje analize.

	<i>Koncentracija soli u sokovima (mM)</i>		
	<i>SSP (pH 7)</i>	<i>SSŽ (pH 3)</i>	<i>SSC (pH7)</i>
<i>KCl</i>	15,1	6,9	6,8
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	3,7	0,9	0,8
<i>NaHCO<sub>3</sub></i>	13,6	25	85
<i>NaCl</i>	-	47,2	38,4
<i>MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub></i>	0,15	0,1	0,33
<i>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></i>	0,06	0,5	-

*\*pH sokova podešavan uz pomoć 0,1M NaOH i 6M HCl*

*Tabela 3. Priprema simuliranih sokova digestivnog trakta*

#### **4.6.3. Određivanje stepena hidrolize (DH)**

Stepen hidrolize (DH) određivan je metodom koju su predstavili Popović i sar., (2013). Ova metoda se zasniva na određivanju količine rastvorljivih proteina u 0,44 mol/L rastvoru TCA (trihlorsirćetne kiseline). U alikvot uzoraka proteina dodata je ista količina hladnog rastvora od 0,44 mol/L TCA. Ova smeša je stavljena u frižider (+4°C) i nakon 30 minuta, istaloženi proteini su uklonjeni centrifugiranjem (Eppendorf Mini spin plus, 14500 rpm, 10 min). U talog pada neistaloženi protein dok u supernatantu ostaje rastvorljiv protein čija se koncentracija određuje metodama Lowry ili Bradford u zavisnosti od vrste uzorka. DH (%) je izražen kao odnos 0,44 mol/l trihlorosirćetna kiselina – TCA – rastvorljivi protein prema ukupnoj reakcionoj smeši proteina (6).

$$DH(\%) = \frac{C_{TCA}}{C_{UK}} * 100 \quad (6)$$

Gde su: C<sub>TCA</sub> koncentracije rastvorljivih proteina u TCA frakciji, C<sub>UK</sub> koncentracije ukupnih proteina u hidrolizatu.

Rastvorljivi proteini su određeni metodom po Lowry (1951).

#### 4.6.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metoda

Antiradikalna aktivnost digestiva prema slobodnim radikalima DPPH (DPPH Radical Scavenging Activiti) određena je spektrofotometrijskom metodom koja se zasniva na principu merenja promene koncentracije stabilnih DPPH radikala u prisustvu ispitivanih uzoraka. Ovo ispitivanje je obavljeno po metodi Morales & Jimenez-Perez [10]. Rastvor DPPH radikala koncentracije 74 mg/ml pripremljen je u etanolu (pripremljen na dnevnoj bazi). 1000 mL rastvora je pomešano sa 200 mL uzorka i stavljeno na tamno mesto 30 minuta na sobnoj temperaturi. Istovremeno, za svaki uzorak pripremljena je sa vodom ili relevantnim puferom umesto uzorka. Nakon što je reakcija završena, uzorci su centrifugirani na 14500 rpm (Eppendorf Mini spin plus) tokom 5 min. Apsorbanca supernatanata je merena na 520 nm (T80/T80 + UV-Vis Spectrophotometer PG instruments Ltd., Lesteršir, Engleska). Antiradikalne aktivnosti (AA%) uzoraka su izračunate prema sledećoj jednačini (7):

$$AA(\%) = \frac{Abs_{sp} - Abs_p}{Abs_p} * 100 \quad (7)$$

gde je  $Abs_{sp}$ apsorbanca u slepoj probi,  $Abs_{sample}$  je apsorbanca rastvora uzorka .

#### 4.6.5. Analiza aktivnosti uklanjanja radikala ABTS

Ovaj test je preciziran ABTS testom dekolorizacije radikala katjona kako su definisali Re i sar., (1999). Ukratko, 30  $\mu$ L uzorka proteina je dodato u 3 mL razblaženog rastvora katjona radikala ABTS ( $A_{734nm} = 0,7 \pm 0,02$ ) i apsorbanca je izmerena posle 10 minuta na 734 nm (T80/T80+ UV-Vis spektrofotometar, PG instruments Ltd. Lesteršir, Engleska). U svakom testu je korišćena odgovarajuća slepa proba. Aktivnost uklanjanja ABTS-a izračunata je kao (8):

$$AA(\%) = \frac{Abs_{sp} - Abs_p}{Abs_p} * 100 \quad (8)$$

gde je  $Abs_{sp}$ apsorbanca u slepoj probi,  $Abs_{sample}$  je apsorbanca rastvora uzorka.

#### 4.7. Određivanje osnovnog hemijskog sastava kreker

Osnovni hemijski sastav (sadržaj sirovih proteina, masti, pepela, vlage) određen je primenom standardnih AOAC metoda (AOAC, 2000). Sadržaj sirovih proteina određen je metodom po Kjeldahlu (AOAC 920.87) pri čemu je korišćen faktor konverzije  $n=6,25$ , sadržaj masti po



Soxlet-u (AOAC 922.06), sadržaj vlage metodom AOAC 925.09 i sadržaj pepela metodom AOAC 923.03. Sadržaj ukupnih ugljenih hidrata određen je računski na osnovu izraza  $100\% - (\% \text{ vlage} + \% \text{ proteina} + \% \text{ masti} + \% \text{ pepela})$  (FSAI, 2010).

#### **4.8. Određivanje fizičkih osobina kreker**

Određivanje fizičkih pokazatelja kvaliteta kreker podrazumevala su određivanje mase, prečnika kreker (D1/D2), visine kreker (h ab ) i visine testa (h bb ). Dimenzije su izmerene na 5 nasumično uzetih kreker iz svake serije uzoraka pomoću pomičnog merila po Šubleru. Prečnik kreker meri se po dve ose (D1 i D2) postavljene normalno jedna u odnosu na drugu. Na osnovu visine kreker i testa kao i prečnika kreker izračunati su sledeći fizički pokazatelji:

- Eksentričnost (eng. eccentricity)- odnos D1/D2 koji je merilo odstupanja od idealno kružnog oblika
- Faktor širenja (eng. spread factor)- odnos između srednje vrednosti prečnika i visine kreker
- Narastanje, %P (eng. puffines) određeno je merenjem visine testa i kreker, a izračunat je po formuli:

#### **4.9. Teksturna svojstva kreker**

Tvrdoća i lomljivost kreker određena je 24 sata posle pečenja, primenom metode „Hardness measurement of biscuits by cutting” uz pomoć teksturometra TA.XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems, UK). Pre izvođenja analize definisani uslovi rada su podrazumevali odabir merne ćelije od 30 kg kao i mernog pribora 3-Point Bending Rig HDP/3PB pomoću koga se tokom merenja registruje maksimalna sila presecanja uzorka postavljenog na metalnu platformu HDP/90. Merenja tvrdoće kreker izvedena su u pet ponavljanja za svaki uzorak pri sledećim radnim parametrima: brzina kretanja poluge do momenta sečenja: 1 mm/s; brzina analize: 3 mm/s; brzina vraćanja poluge nakon sečenja: 10 mm/s; rastojanje: 5 mm.

#### **4.10. Određivanje boje**

Boja inkapsulata određena je uz pomoć kolorimetra Minolta Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) i sistema boja CIE Lab. Uzorci su smešteni u providnu plastičnu ćeliju debljine 15 mm bez poklopca. Crna podloga je korišćena kao podloga za

standardizaciju, a bela ploča za kalibraciju. Rezultati su izraženi prema CIE Lab sistemu boja gde su koordinate definisane na sledeći način:  $L^*$  je koordinata svetloće boje (gde 0 označava crno, a 100 belo),  $a^*$  je udeo crvene/zelene boje (gde  $a^* > 0$  označava crvenu i  $a^* < 0$  označava zelenu boju), i  $b^*$  je udeo žute/plave boje (gde  $b^* > 0$  označava žutu i  $b^* < 0$  označava plavu boju).

#### **4.11. Senzorska analiza kreker**

Senzorska analiza kreker izvedena je primenom deskriptivne senzorske analize od strane ekspertskeg panela sastavljenog od deset ocenjivača (6 žena i 4 muškarca, starosti od 25 do 40 godina) sa iskustvom u oceni senzorskog kvaliteta različitih vrsta finih pekarskih proizvoda. Dodatno, ocenjena je dopadljivost kreker u pogledu izgleda, mirisa, ukusa, arome i teksture korišćenjem hedonske skale sa rasponom ocena od 1 do 9, gde je 1 – izuzetno mi se ne sviđa, 5 – niti mi se sviđa niti mi se ne sviđa, 9 – izuzetno mi se sviđa.

Senzorska ocena kreker sprovedena je u Laboratoriji za senzorske i tehničke analize FINSLab-a, koja je opremljena u skladu sa važećim standardom (ISO 8589:2007). Odgovarajući deskriptori su definisani metodom konsezusa, prema smernicama datim u standardu ISO 11035 (ISO, 1994). Konačna lista deskriptora obuhvatala je sledeća svojstva: izgled (pravilnost oblika, hrapavost, uniformnost boje), miris (ukupni intenzitet, miris na integralno pšenično brašno, miris na brokoli, miris na leblebiju, miris na pečeno), aromu (ukupni intenzitet, aroma na integralno pšenično brašno, aroma na brokoli, aroma na leblebiju, postojanost arome), ukus (slano, slatko i gorko) i teksturna svojstva (tvrdoću, zrnastost, stepen rastvaranja u ustima i hrskavost). Uzorci kreker su ocenjeni na nestrukturiranoj linearnoj skali od 0 do 100 mm, gde 0 ukazuje na nepostojanje svojstva a 100 na znatno izraženo svojstvo.

Ocenjivačima su uzorci kreker dostavljani u zasebne kabine, u kojima se pored uzoraka nalazio i pribor za ocenjivanje kao i čaša sa destilovanom vodom za ispiranje usta između dva uzastopna uzorka.

Uzorci su dostavljani svim ocenjivačima u isto vreme i bili su označeni nasumično odabranim trocifrenim šiframa, što je sa jedne strane obezbedilo identifikaciju i sledljivost rezultata ocenjivanja, a sa druge strane omogućilo da se izbegne potencijalna pristrasnost pri oceni.

Statistička analiza Srednje vrednosti replika za rezultate su podvrgnute jednosmernoj analizi varijanse (ANOVA). Značajne razlike između sredstava tretmana uočene su Fišerovim testom najmanjih značajnih razlika ( $p < 0,05$ ) korišćenjem softvera OriginLab (Northampton, SAD). Svi podaci su rezultati tri ponavljanja i izraženi su kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija.

## 5. Rezultati i diskusija

### 5.1. Otpadno lišće kao novi izvor funkcionalnih i biološki aktivnih proteina

*U ovom poglavlju doktorske disertacije ispitan je potencijal lišća koje vodi poreklo od četiri kulture – karfiola, kupusa, brokolija i cvekle kao nusproizvoda agroindustrije, za dobijanje proteina radi njihove primene u prehrambenoj industriji. Određena su funkcionalna svojstva dobijenih proteina, kao što su: rastvorljivost, kapacitet apsorpcije vode i ulja, svojstva pene i emulgovanja. Takođe, analizirana je i njihova svarljivost u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta i određena antioksidativna aktivnost u dobijenim proteinskim hidrolizatima nakon in vitro digestije.*

#### 5.1.1. Izolovanje i karakterizacija proteina lišća

Kao što je već rečeno, velike količine nusproizvoda agroindustrije generiše se svake godine, a njihovo nagomilavanje može da ima samo negativan uticaj na životnu sredinu. Između ostalog, lišće je jedan od nusproizvoda koje čini veliki deo otpada (Slika 14), a predstavlja potencijalni izvor visoko vrednih jedinjenja. Njegova primena kao izvora proteina zabeležena je još 1960. godine (Righetti i sar., 2016; Badar i sar., 2011.) i od tad brojnim naučnim studijama je pokazano da ima veliki potencijal u primeni kao novi izvor proteina koji se mogu koristiti u prehrambenim formulacijama i kao stočna hrana.



*Slika 14. Izgled lišća, nusproizvoda, kupusa, karfiola, cvekle i brokolija provereni*

### 5.1.1.1. Hemijski sastav proteina lišća

Da bi se odredio proteinski profil u lišću karfiola, brokolija kupusa i cvekle izvedena je ekstrakcija proteina prema Ozbornoj metodi. U Tabeli 4 prikazani su rezultati dobijenih proteinskih frakcija klasifikovani u sledeće kategorije: albumine, globuline, gluteline i prolamine.

<i>Parametri</i>	<i>Izvor lišća</i>			
	<i>Karfiol</i>	<i>Brokoli</i>	<i>Kupus</i>	<i>Cvekla</i>
<i>Albumin (%)</i>	41,98±0,34 <sup>b</sup>	31,66±0,09 <sup>a</sup>	54,33±0,33 <sup>d</sup>	49,21±0,72 <sup>c</sup>
<i>Globulin (%)</i>	16,37±0,67 <sup>a</sup>	15,89±0,39 <sup>a</sup>	19,36±0,35 <sup>b</sup>	15,06±0,73 <sup>a</sup>
<i>Glutelin (%)</i>	28,21±0,47 <sup>d</sup>	22,75±0,08 <sup>b</sup>	15,11±0,31 <sup>a</sup>	24,23±0,24 <sup>c</sup>
<i>Prolamin (%)</i>	13,43±0,56 <sup>b</sup>	29,68±0,94 <sup>c</sup>	11,21±0,41 <sup>a</sup>	11,48±0,32 <sup>a</sup>
<i>Sadržaj proteina (%)</i>	4,76±0,06 <sup>b</sup>	6,13±0,09 <sup>d</sup>	3,39±0,17 <sup>a</sup>	5,36±0,04 <sup>c</sup>

Tabela 4. Sadržaj proteinskih frakcija u otpadnom lišću prema Ozbornoj klasifikaciji proteina

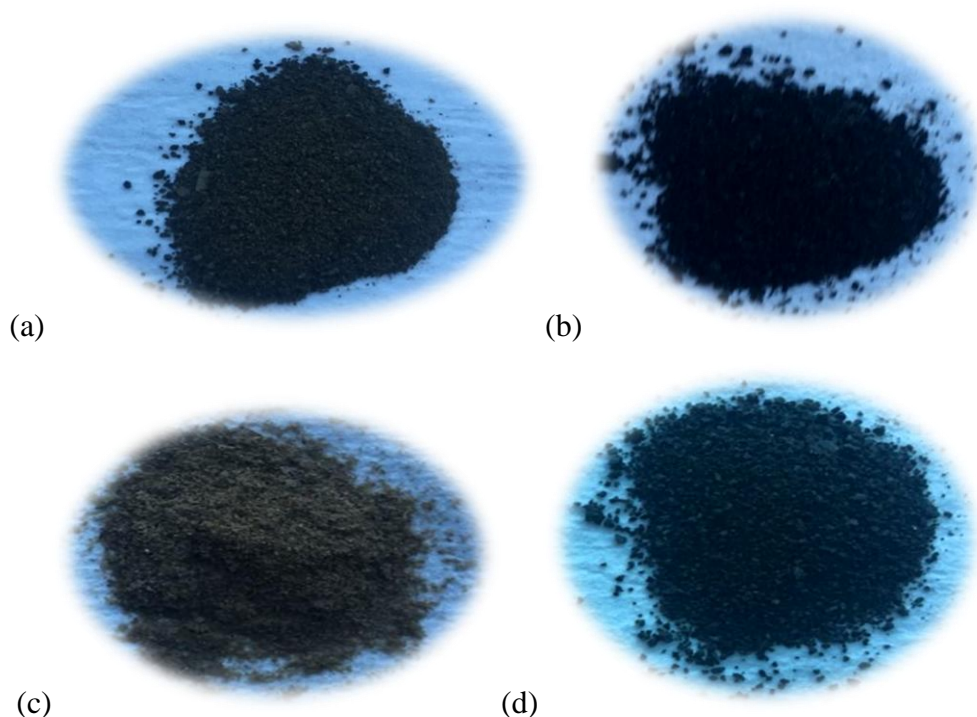
Vrednosti u istom redu za različite vrste sirovina statistički se značajno ( $p < 0,05$ ) razlikuju.

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija ( $n = 3$ )

Može se primetiti da je dominantna proteinska frakcija, u svim izvorima, albumini. Njihov sadržaj je iznad 40%, za svo lišće, osim brokolija, gde je iznos 31,66%. Slična distribucija proteinskih frakcija opisana je od strane Hojila-Evangelista i sar., (2016) gde je albumin takođe predstavljao glavnu komponentu osušenih listova i stabljika biljke lucerke. Druga po sadržaju frakcija u lišću karfiola i cvekle su glutelini, dok su za kupus to globulini, a kod lišća brokolija prolamini. Najmanji sadržaj proteinske frakcije u lišću karfiola, kupusa i cvekle zauzimaju prolamini, a kod lišća brokolija globulini. Ukupni proteinski sadržaj u lišću kreće se u rasponu između 3,39 - 6,13%, pri čemu je najveći kod lista brokolija, a najniži kod lista cvekle. Ovi

rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima koji ukazuju na to da se sadržaj proteina u sličnom biljnom izvoru kreće između 2 – 5% (Saha i Dekka., 2017).

Izolovanje proteina iz lišća izvedeno je alkalnom ekstrakcijom praćenom izoelektričnim taloženjem, nakon toga sušenjem i spraišivanjem. Izgled proteina lišća prikazan je na Slici 15. Dobijene proteine lišća karfiola, kupusa i brokolija karakteriše tamno - braon boja, dok protein lišća kupusa karakteriše zeleno – braon boja.



*Slika 15. Proteini izolovani alkalnom ekstrakcijom iz lišća (a) karfiola, (b) brokolija, (c) kupusa i (d) cvekle*

Ispitan je hemijski sastav izolovanih proteina iz svih uzoraka lišća: određen je procenat sadržaja vlage, pepela, masti ukupnih šećera i proteina. Takođe, određen je ekstrakcioni proteinski prinos. Rezultati su prikazani u Tabeli 5.

<b>Parametri</b>	<b>Protein lišća</b>			
	<b>Karfiol</b>	<b>Brokoli</b>	<b>Kupus</b>	<b>Cvekla</b>
<b>Vlaga (%)</b>	13,12±0,12 <sup>d</sup>	10,37±0,02 <sup>b</sup>	10,23±0,10 <sup>a, b</sup>	11,74±0,10 <sup>c</sup>
<b>Pepeo (%)</b>	2,27±0,07 <sup>b</sup>	1,88±0,03 <sup>a</sup>	1,81±0,04 <sup>a, c</sup>	9,81±0,04 <sup>d</sup>
<b>Masti (%)</b>	6,11±0,09 <sup>d</sup>	5,22±0,06 <sup>b</sup>	3,44±0,19 <sup>a</sup>	5,37±0,24 <sup>c, b</sup>
<b>Ukupni ugljeni hidrati (%)</b>	25,17±0,25 <sup>a</sup>	40,31±0,17 <sup>d</sup>	36,35±0,27 <sup>c</sup>	33,32±0,44 <sup>b</sup>
<b>Sadržaj proteina (%)</b>	71,83±0,27 <sup>d</sup>	56,86±0,48 <sup>b</sup>	64,88±0,44 <sup>c</sup>	53,55±0,45 <sup>a</sup>
<b>Ekstrakcioni proteinski prinos (%)</b>	6,83±0,24 <sup>c</sup>	4,38±0,17 <sup>a</sup>	14,21±0,07 <sup>d</sup>	6,17±0,24 <sup>b</sup>

*Tabela 5. Hemijski sastav i ekstrakcioni prinos proteina lišća*

*Vrednosti u istom redu za različite vrste sirovina statistički se značajno ( $p < 0,05$ ) razlikuju.*

*Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ( $n = 3$ )*

Prema rezultatima u Tabeli 5, najveći sadržaj pepela imao je protein lišća cvekle 9%, dok je za ostale bio znatno niži, i iznosio je oko 2%. Sadržaj ukupnih šećera bio je između 25 – 40 %, najveći za protein lišća brokolija, a najmanji za protein lišća karfiola. Procenat masti je u rasponu od 3 – 5%, što je vrlo mala vrednost u poređenju sa proteinskim izolatima koji se dobijaju iz nusproizvoda proizvodnje i prerade ulja, i što je prednost u odnosu na te izvore.

Prema sadržaju proteina koji je za protein lišća karfiola: 72%, kupusa. 65%, brokolija: 57% i cvekle: 54%, može se zaključiti da se dobijaju relativno čisti i umereno koncentrovani proteinski proizvodi. Ukoliko se ovi rezultati uporede sa rezultatima za koncentrat proteina *Diplazium esculentum* (Saha i Dekka, 2017) (34,28%), koji je dobijen ekstrakcijom uz pomoć ultrazvuka, može se reći da je sadržaj proteina značajno veći, dok je približno isti sadržaju proteina u koncentratu iz lišća lucerke (60%) (Hojila-Evangelista i sar., 2016) i karfiola (72%) (Yang Xu i sar., 2017). Što se tiče ekstrakcionog prinosa proteina, najviši je postignut kod lišća kupusa 14%, dok je kod karfiola 7%, cvekle 6%, a najniži kod brokolija 4%. Ove vrednosti su značajno niže u poređenju sa vrednostima ekstrakcionim prinosima proteina koncentrata lucerke (36%) (Hojila-

Evangelista i sar., 2016) i lišća *jackfruita* (32%) (Calderon-Chiu C i sar., 2021), ali se mora napomenuti da je kod ovih uzoraka primenjen ultrazvučni predtretman i optimizacija procesa ekstrakcije, pa samim tim se ostvaruju više vrednosti za prinos proteina.

#### **5.1.1.2. Karakterizacija proteina lišća**

Karakterizacija proteina lišća izvršena je:

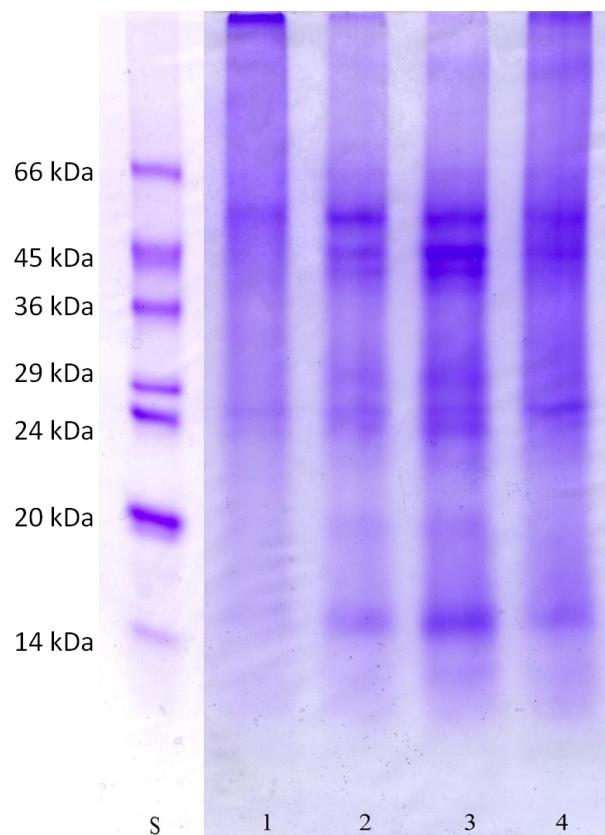
- primenom natrijumdodecil-sulfat poliakrilamid gel elektroforeze (SDS–PAGE),
- metodom infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR) i
- određivanjem funkcionalnih osobina.

##### **5.1.1.2.1. SDS-PAGE**

SDS–PAGE predstavlja tehniku za razdvajanje denaturisanih proteina na osnovu njihove relativne molekulske mase. Natrijum–dodecilsulfat (SDS), jak anjonski deterdžent, obezbeđuje uslove u kojima dolazi do disocijacije proteina na individualne polipeptidne podjedinice, čime sprečava njihovu agregaciju. Potom sledi vezivanje proteina za SDS, pri čemu oni dobijaju stiču negativno naelektrisanje, a količina SDS-a proporcionalna je molekulskoj masi polipeptida. Tako vezani SDS–polipeptidni kompleksi migriraju kroz gel u zavisnosti od njihove veličine odnosno molekulske mase.

Distribucija proteinskih frakcija u proteinima lišća, karfiola, brokolija, kupusa i cvekle prikazani su na Slici 16.





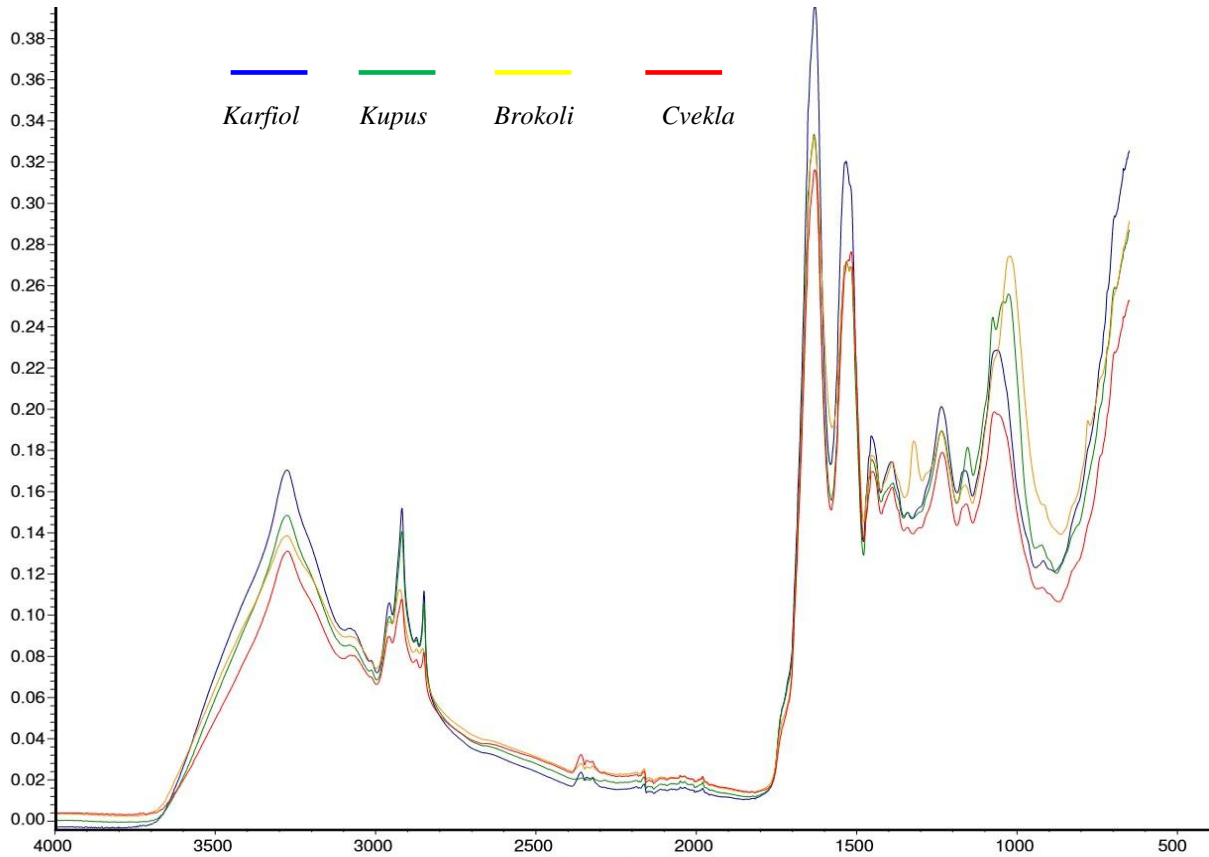
*Slika 16. SDS-PAGE profil proteina lišća cvekle (linija 1), kupusa (linija 2), karfiola (linija 3) i brokolija (linija 4), zajedno sa standardnim proteinskim markerima (linija S)*

Posmatrajući dobijeni elektroforetski profil proteina lišća može se zaključiti da su prisutne frakcije proteina niske molekulske mase, prikazane polipeptidnim trakama između 14 i 66 kDa. Dominira prisustvo tri grupe intenzivnih traka koje odgovaraju molekulskim masama od 14, 25 i 45, kDa. Polipeptidne trake od 14 kDa pripadaju najzastupljenijoj frakciji proteina -albuminima, a polipeptidne trake od 25 kDa pripadaju globulinskoj frakciji proteina. Takođe, može se reći da polipeptidne trake u području molekulskih masa od 24 - 29 kDa pripadaju proteinskim frakcijama glutelina i prolamina. Ovako dobijeni proteinski profili su u skladu sa Osbornovom klasifikacijom koja je prethodno opisana u Tabeli X. Može se primetiti da su trake proteina lišća cvekle (linija 1) imale najmanji intenzitet u odnosu na ostale protein lišća, što je posledica najmanjeg sadržaja proteina (54%) u ovom proteinu lišća. Slični proteinski profili su proteinase dobijeni iz lišća šećerne repe koji je sadržao karakteristične podjedinice od oko 50 kDa i 14 kDa (Tamayo Tenorio i sar., 2016) kao i iz lišća lucerke sa dominantnim polipeptidnim trakama od oko 49 kDa, 30 kDa, i manjim podjedinicama od 10-12 kDa (Lamsal i sar., 2007).

### 5.1.1.2.2. FTIR spektroskopija

FTIR spektrometrija pruža informacije o sadržaju sekundarne strukture proteina. FTIR spektroskopija radi na principu infracrvenog zračenja na uzorak i praćenje talasnih dužina zračenja u infracrvenom području spektra koje se apsorbiraju u uzorku. Svako jedinjenje ima karakterističan skup apsorpcionih traka u svom infracrvenom spektru. Karakteristične trake pronađene u infracrvenom spektru proteina i polipeptida uključuju Amid I i Amid II, a nastaju nastaju iz amidnih veza koji povezuju aminokiseline.

Sekundarna struktura proteina lišća ispitana je FTIR spektroskopijom i njihovi spektri u rasponu talasnih dužina od 500 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  prikazani su na Slici 17.



Slika 17. FTIR spektri proteina lišća karfiola, kupusa, brokolija i cvekle

Sa Slike 17, može jasno da se uoči da proteini lišća imaju međusobno veoma sličan (skoro identičan) profil spektra, a pokazuju apsorpciju na talasnim dužinama koje odgovaraju

karakterističnoj strukturi proteina. Za protein lišća karfiola, kupusa, brokolija i cvekle uočene su apsorpcije na 3278  $\text{cm}^{-1}$  koja predstavlja Amid A strukturu, a potiče od istežanja N-H grupe i vodoničnih veza, na 2925  $\text{cm}^{-1}$  predstavlja Amid B, a nastaje usled adsorpcije rastežanja C – H veze, na 1630  $\text{cm}^{-1}$  koji je deo Amid I strukture, i predstavlja istežanje C=O, vodoničnu vezu i COO- grupu, na 1527  $\text{cm}^{-1}$ , deo Amid II strukture koja predstavlja istežanje C-N grupe i N-H savijanje, i 1232  $\text{cm}^{-1}$  Amid III koja predstavlja istežanje C-N i N-H veza ili vibraciju CH<sub>2</sub> grupa.

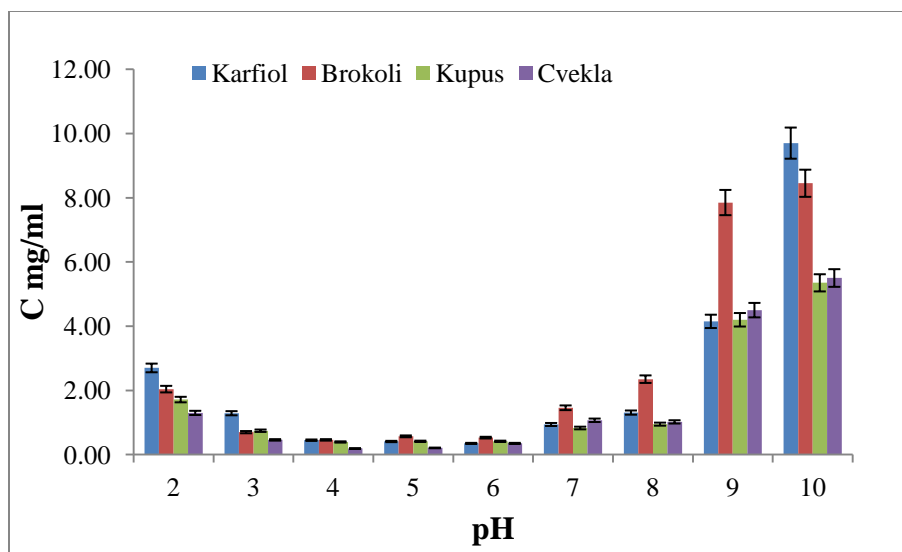
### **5.1.1.3. Funkcionalne osobine proteina lišća**

Upotreba biljnih proteina u prehrambenoj ili kozmetičkoj industriji u velikoj meri je određena njihovim funkcionalnim osobinama. One utiču na ponašanje sistema tokom njegove proizvodnje, skladištenja, pripreme i konzumacije i zavise od fizičkih i hemijskih osobina, molekularne strukture i veličine proteina. U ovom delu disertacije prikazana su funkcionalna svojstva proteina lišća karfiola, brokolija, kupusa i cvekle u pogledu rastvorljivosti, emulzionih osobina, sposobnosti formiranja pene i kapaciteta vezivanja vode i ulja.

#### **5.1.1.3.1. Rastvorljivost**

Rastvorljivost je jedna od najvažnijih funkcionalnih osobina proteina jer značajno utiče na teksturu, boju i senzorna svojstva proizvoda koji sadrže ova jedinjenja. Intenzivno je povezana sa kapacitetom zadržavanja vode i drugim fizičko-hemijskim i funkcionalnim svojstvima proteina kao što su emulgovanje i želiranje i utiče na primenu proteina u formulacijama hrane. Na rastvorljivost proteina najviše utiče pH vrednost sredine.

Rastvorljivost proteina lišća karfiola, brokolija, cvekle i kupusa u zavisnosti od pH vrednosti sredine predstavljena je na Slici 18. Raspon ispitivane pH vrednosti se kretao od pH 2 – pH 10.



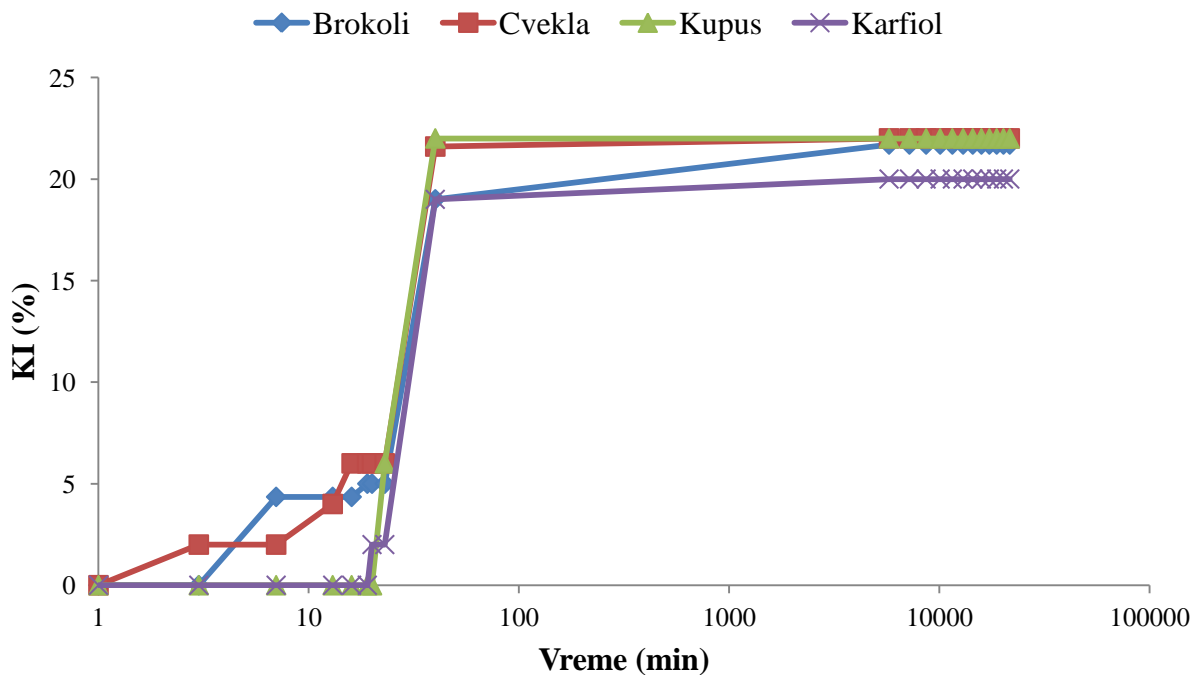
Slika 18. Profil rastvorljivosti proteina lišća karfiola, brokolija, kupusa i cvekla pri različitoj pH vrednosti

Na Slici 18 uočava se da svi ispitivani proteini lišća imaju međusobno sličan trend rastvorljivosti gde je minimalna rastvorljivost između pH 4 i 6, što ukazuje na pH vrednosti izoelektričnih tački proteina (pI). Na pH vrednostima udaljenim od pI proteina, rastvorljivost se povećava za sve ispitivane uzorke. Maksimalna rastvorljivost, u ispitivanom pH opsegu (od pH 2 do 10) postignuta je na pH 10 (9,7 mg/ml za protein lista karfiola, 8,45 mg/ml za protein lista brokolija, 5,35 mg/ml za protein lista kupusa i 5,5 mg/ml za protein lista cvekla). Kada se ovi rezultati uporede sa profilom rastvorljivosti proteina mahunarki i semena uljarica koji imaju karakterističan U-oblik (Guan i sar., 2007) (visoka rastvorljivost u ekstremnim kiselim i alkalnim sredinama) jasno se vidi se da ovi proteini lišća imaju različit profil rastvorljivosti. Značajno veća rastvorljivost je u alkalnoj sredini, u odnosu na kiselu sredinu. Zapaža se širi opseg pH vrednosti izoelektrične tačke, a ovo je značajno jer određuje njihovu upotrebu u različitim formulacijama proizvoda. Rezultati u literaturi opisuju slično ponašanje rastvorljivosti za proteinski koncentrat lišća luceke (minimalna rastvorljivost na pH 4, a najveća rastvorljivost u alkalnoj sedini) (Hadidi i sar., 2020), kao i za proteinski izolat kajsije (Čakarević i sar., 2019).

### 5.1.1.3.2. Emulzione osobine

Emulzione osobine su mera efikasnosti proteinskih emulgatora u smislu kapaciteta emulgovanja, stabilnosti emulzija i aktivnosti emulgovanja (Pearce i Kinsella, 1978). Kriming je jedan od ključnih pokazatelja sedimentacione nestabilnosti emulzija. Ovaj fenomen se obično pripisuje tendenciji kapljica ulja u emulziji da se usled razlike u specifičnoj težini faza pomeraju nagore i formiraju sloj na površini emulzije.

Efikasnost proteina lišća karfiola, brokolija, kupusa i cvekle kao emulgatora, ispitivana je pomoću kriming testa, praćenjem kriming indeksa (KI). Na Slici 19 prikazan je KI za sve četiri vrste proteina lišća u toku vremena skladištenja.



Slika 19. Kriming indeks 15% emulzija ulje u vodi pripremljenih sa 10mg/ml rastvorom proteina lišća (brokoli, cvekla, kupus, karfiol) tokom 14 dana skladištenja

Osobine proteina lišća kao emulgatora ispitane su je ispitana pripremanjem 15% emulzija ulja u vodenom rastvoru proteina koncentracije 10mg/ml i praćenjem KI tokom 14 dana skladištenja emulzije. Rezultati ukazuju da tokom vremena, dolazi do raslojavanja emulzija na sloj kreme (sloj na vrhu) koja je bogata kapljicama ulja i sloj seruma (na dnu) u kome preovladava

kontinualna faza (Bučko i sar, 2020). Nešto bolju stabilnost pokazale su emulzije pripremljene od proteina lišća kupusa i karfiola, gde raslojavanje emulzija započinje nakon 23 (KI 6%), odnosno 20 minuta (KI 2%). Tačnije, u slučaju proteina lišća kupusa odnosno karfiola, raslojavanje emulzije raste sa povećanjem KI do 22% odnosno 19% nakon 4 dana stajanja gde te vrednosti ostaju konačne tokom 14 dana skladištenja. Raslojavanje emulzija pripremljenih od proteina lišća cvekle i brokolija započinje skoro odmah nakon pripreme. Iako do potpunog raslojavanja emulzija dolazi nakon 40 minuta, a nije dolazilo do izdvajanja kapljica ulja, smatra se da je integritet kapljica uspešno održan proteinima lišća. Dakle, prošireno je posmatranje stabilnosti emulzija do 14 dana sa ciljem da istražiti da li će neki od drugih mehanizama nestabilnosti odigrati i samim tim uticati na stabilnost emulzije ili dovesti do kompletnog razdvajanja faza. Stoga, moglo bi se reći da ispitivani proteini lišća mogu da se upotrebe kao potencijalni emulgatori za pripremu emulzija u industriji.

#### **5.1.1.3.3. Sposobnost formiranja pene**

Sposobnost formiranja pene, takođe se smatra važnom osobinom proteinskih izolata za njihovu upotrebu u raznim prehrambenim aplikacijama (aeracija, mućenje). Proteini deluju kao površinski aktivni agensi i potrebni su da stabilizuju gasovitu dispergovanu fazu, snižavaju površinski napon na međufaznoj površini vazduh/voda što dovodi do stvaranja pene. Kapacitet pene (FC) se određuje pomoću različitih karakteristika proteina kao što su sposobnost proteina da smanji površinski napon, molekularne fleksibilnosti i fizičko-hemijskih svojstava (hidrofobnost, raspodela naelektrisanja, hidrodinamička svojstva (Graham i Philips, 1976). Stabilnost pene (FS) može da se meri kao vreme potrebno za smanjenje 50% zapremine pene, i ukazuje na sposobnost stabilizacije protiv gravitacionih i mehaničkih naprezanja (Damodaran, 1997).

<i>Proteini lišća</i>				
<i>Parametar</i>	<i>Karfiol</i>	<i>Brokoli</i>	<i>Kupus</i>	<i>Cvekla</i>
<i>FC (%)</i>	90.20±1.32 <sup>c</sup>	86.30±0.68 <sup>a</sup>	92.00±1.60 <sup>c, b</sup>	87.50±1.32 <sup>a, c</sup>

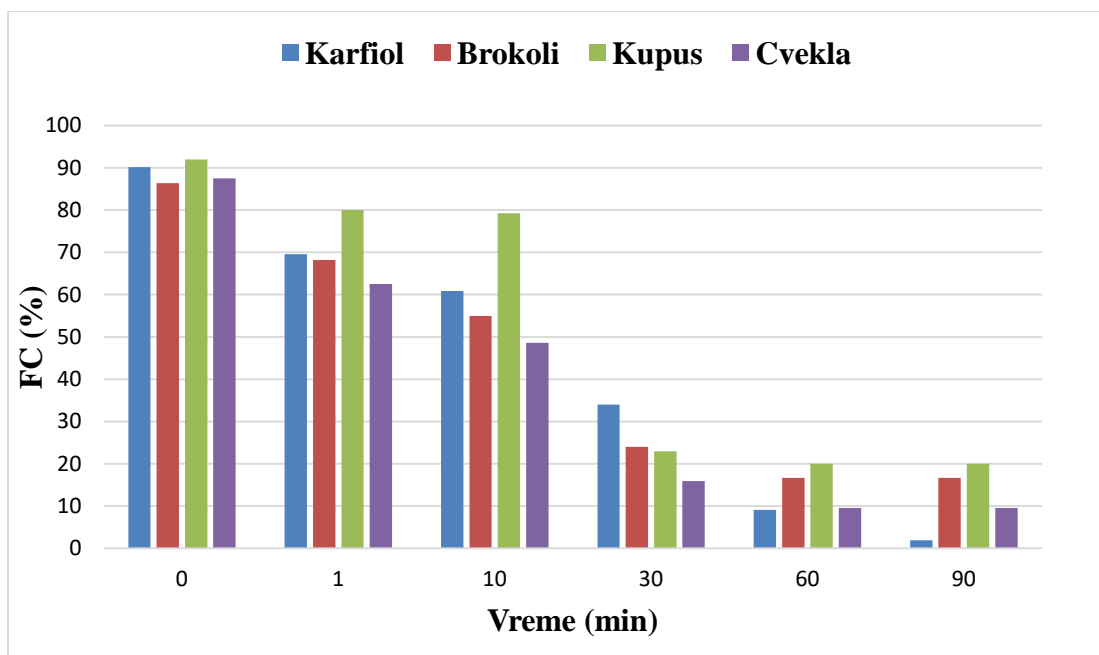
*Tabela 6. Kapacitet pene proteina lišća*

*Vrednosti u istom redu za različite vrste sirovina statistički se značajno ( $p < 0,05$ ) razlikuju.*

*Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ( $n = 3$ )*

Vrednosti kapaciteta pene sva četiri ispitivana proteina lišća prikazan je u Tabeli 6. Visoke vrednosti kapaciteta pene mogu se objasniti visokom rastvorljivošću proteina lišća na pH 10 (na osnovu profila rastvorljivosti, ova pH vrednost je odabrana za određivanje FC). Takođe, može se zaključiti još, da su vrednosti u korelaciji sa sadržajem proteina u proteinima lišća. Najveće vrednosti FC imaju proteini lišća kupusa i karfiola (90% i 92%), dok nešto manje vrednosti imaju proteini lišća brokolija i cvekle (86% i 88%). Dobijene vrednosti su superiornije u poređenju sa vrednostima za druge izvore proteina kao što su mungo pasulj (76,6%) i leblebija (30,4-44,3%) (Du i sar., 2008; Kauri Singh, 2007), ali niže od proteina surutke (176-600%) i proteina belanca jajeta (500-800%) (Pernell i sar., 2018). Može se zaključiti da se svi ispitivani proteini lišća mogu smatrati pogodnim sastojcima sa svojstvima pogodnim za formiranje pene u upotrebi u različitim prehrambenim proizvodima, kao što su kolači, hleb, šlag i neki konditorski proizvodi.

Na Slici 20 prikazana je stabilnost pene proteina lišća tokom 90 minuta stajanja pene.



*Slika 20. Stabilnost pene proteina lišća karfiola, brokolija, kupusa i cvekla*

Sa Slike 20 može se zaključiti da tokom vremena stabilnost pene se smanjuje za sve ispitivane proteine lišća. Najveću stabilnost tokom prvih deset minuta ima protein lišća kupusa, zadržavajući 80% inicijalne zapremine pene, a nakon 30 minuta dolazi do značajnog razrušavanja pene koja ostaje konstantna do kraja 90 minuta (20%). Slično ponašanje pokazuje i protein lišća karfiola. U svakom slučaju, kod svih uzoraka dolazi do potpunog razrušavanja pene nakon 90 minuta. Ovako ponašanje pokazuje i koncentrat proteina lišća lucerke na pH 10 (Lamsal i sar., 2007).

#### **5.1.1.3.4. Kapacitet vezivanja vode i ulja**

Kapacitet vezivanja vode/ulja predstavljaju sposobnost vode tj. ulja, respektivno, da vežu bočne lance proteina. Za karakteristiku koja se opisuje kao “osećaj u ustima” i za teksturu hrane, veoma je važna interakcija između vode i ulja sa proteinima, u nekim proizvodima (Suresh i sar., 2014), kao što su hleb i kolači, takođe i za karakteristike “lepljive” hrane kao što su supe, dresinzi ili slatkiši (Adebowale i sar., 2005).



<i>Proteini lišća</i>				
<i>Parametar</i>	<i>Karfiol</i>	<i>Brokoli</i>	<i>Kupus</i>	<i>Cvekla</i>
<i>Kapacitet vezivanja ulja (g/g)</i>	0.56±0.03 <sup>a</sup>	0.64±0.03 <sup>b</sup>	0.64±0.03 <sup>b, c</sup>	0.61±0.02 <sup>a, b</sup>
<i>Kapacitet vezivanja vode (g/g)</i>	1.61±0.02 <sup>d</sup>	1.31±0.03 <sup>b</sup>	1.49±0.01 <sup>c</sup>	0.62±0.02 <sup>a</sup>

*Tabela 7. Kapacitet vezivanja ulja i vode proteina lišća karfiola, brokolija, kupusa i cvekle. Vrednosti u istom redu za različite vrste sirovina statistički se značajno ( $p < 0,05$ ) razlikuju.*

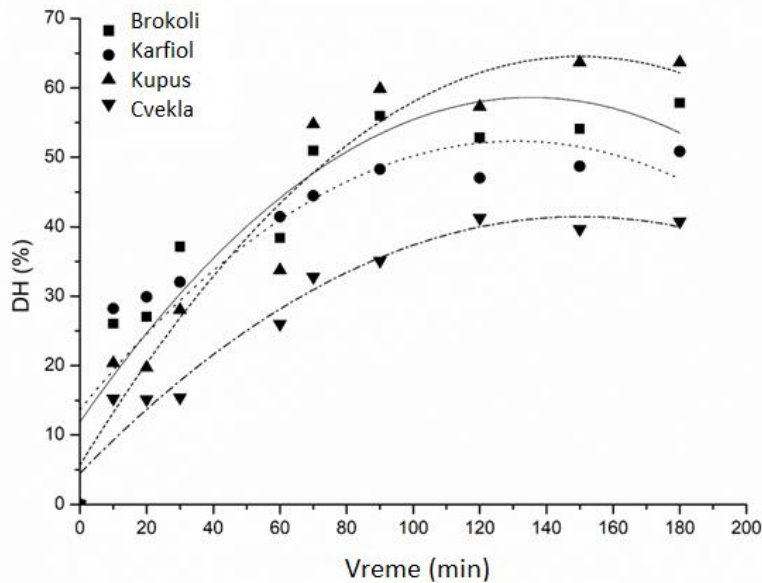
*Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ( $n = 3$ )*

Najveći kapacitet vezivanja vode je zapažen kod proteina lišća karfiola (1,61 g/g) (Tabela 7), dok vrednosti za protein lišća kupusa i brokolija ne poseduju međusobnu značajnu razliku i imaju nešto niže vrednosti od proteina lišća karfiola, a najniža vrednost postignuta je kod proteina lišća cvekle. Niska vrednost za kapacitet vezivanja vode proteina lišća cvekle u korelaciji je sa njegovom nižom rastvorljivošću u odnosu na ostale proteine lišća (Slika 18) (Benelhadj i sar., 2016) i jasno je da se ovaj protein ne može primeniti u prehrambenim proizvodima na neutralnim pH vrednostima. Dalje, dobijeni rezultati sugerišu da su proteini lišća sa povoljnim kapacitetom vezivanja vode protein lišća karfiola, kupusa i brokolija uporedivi sa kapacitetom vezivanja vode sojinog proteina (1,26 g/g) (Amza i sar., 2011), ali imaju značajno niže vrednosti od vrednosti kapaciteta vezivanja vode proteina: žutog graška (4,2 g/g), zelenog sočiva (3,9 g/g), ili proteinskog koncentrata crvenog sočiva (3,7 g/g) (Zhu i sar., 2019). U literaturi je pronađeno da vrednosti kapaciteta vezivanja vode proteina koje variraju od 1,49 do 4,72 g/g, mogu primeniti u prehrambenim proizvodima lepljive strukture (Aletor i sar., 2002). Ovi rezultati su pokazali da se protein lišća kupusa i karfiola može primeniti u hrani kao što su supe i prelive (dresinzi). Što se tiče dobijenih rezultata za vrednosti kapaciteta vezivanja ulja (Tabela 7) vidi se da su bile prilično niske, 0,6 g/g, što je prema nekim literaturnim podacima (Du i sar., 2018) i kod drugih proteinskih izolata okarakterisano kao veoma niska vrednost. Može se zaključiti da ovi proteina lišća nisu pokazali poželjnu sposobnost da apsorbuju i zadržavaju ulje te stoga ne mogu naći primenu u upotrebi kod prehrambenih proizvoda gde je ta osobina poželjna.

### 5.1.2. Ispitivanje svarljivosti proteina lišća - *In vitro* digestija

Sistemi za varenje *in vitro* predstavljaju alate za razumevanje i praćenje složenog ponašanja degradacije hrane tokom varenja, čime su se pokazali kao dobri modeli za zamenu *in vivo* testova.

Kao standard, nutritivni kvalitet proteinske frakcije hrane poželjno je proučavati *in vivo* (kod ljudi ili životinja), ali ovi eksperimenti su skupi, tehnički teški, dugotrajni i često nose sa sobom ozbiljne etičke probleme (Minekus i sar., 2014). Dakle, potreba za *in vitro* modelima koji blisko oponašaju fiziološke procese koji se dešavaju u ljudskom digestivnom traktu dovela je do razvoja *in vitro* modela digestije kao alternativa eksperimentima *in vivo*. Ovi modeli uzimaju u obzir fiziološke uslove koji se odnose na prisustvo i koncentraciju digestivnih enzima, pH vrednosti u različitim fazama (želuca i creva), vreme varenja i koncentracije soli. Upotreba proteina u prehrambenim proizvodima u prvom redu zavisi od njihove svarljivosti u ljudskom organizmu. Varenje proteina lišća *in vitro* vrši se u dva koraka, u gastričnoj i intestinalnoj fazi, uz pomoć gastrointestinalnih enzima - proteaza, prvo hidrolizom pepsinom a zatim pankreatinom.



Slika 21. Vremenski tok promene stepena hidrolize (DH %) proteina lišća u procesu *in vitro* digestije u toku dve faze : pepsinske (60 min) i pankreatinske (od 60 do 180 min)

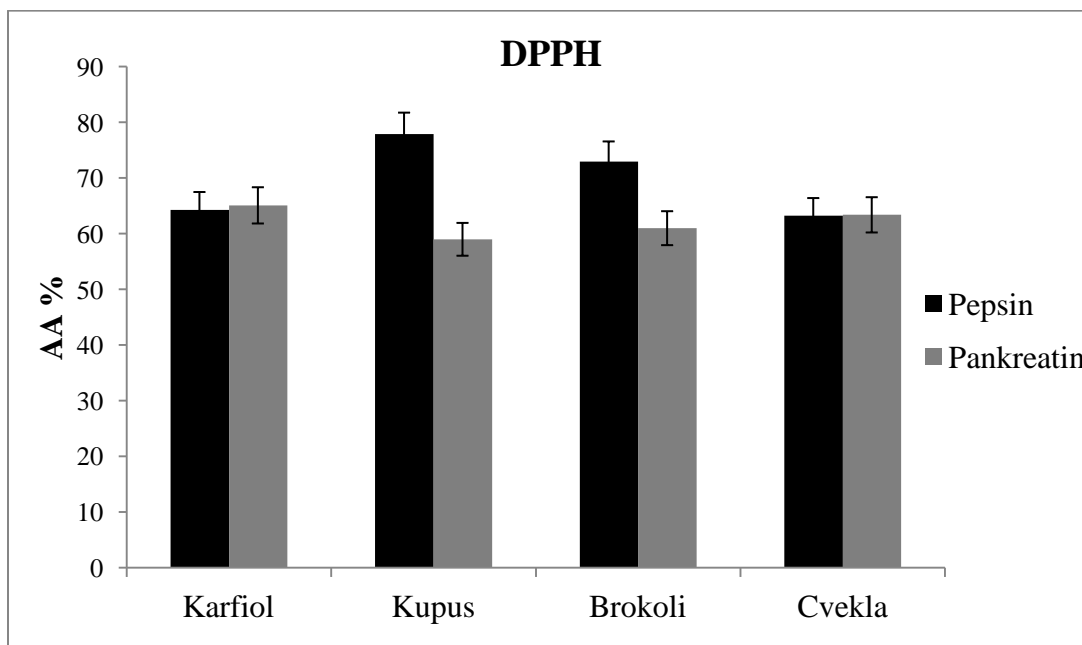
Tok *in vitro* digestije proteina lišća karfiola, kupusa, brokolija i cvekla prikazan je na Slici 21. Stepenn hidrolize (DH %) je parametar koji je korišćen za praćenje procesa digestije proteina.

Tokom simuliranog varenja, tok hidrolize svih uzoraka proteina lišća ima sličan trend krive. Može se primetiti da su DH vrednosti za protein lišća cvekla bile značajno niže u poređenju sa ostalim proteinima, što je u direktnoj vezi sa sadržajem proteina (Tabela 5). Nakon digestije pepsinom (prvih 60 minuta), vrednost DH za proteina lišća karfiola, brokolija, kupusa i cvekla dostiže vrednosti od 41,45%, 38,36%, 33,75% i 26%, respektivno. Dalje, digestija pankreatinom (do 180 minuta) dovela je do daljeg povećanja DH u sva četiri hidrolizata, gde su konačne vrednosti za protein lišća karfiola iznosile 50,85%, brokolija: 57,86%, kupusa: 63,69% i cvekla: 40,76%. Ovi podaci pokazuju da proteini izolovani iz lišća povrća nisu otporni ni na pepsin ni na enzime pankreasa i mogu se lako svariti što ima veliki uticaj u njihovoj potencijalnoj primeni u različitim prehrambenim proizvodima i daje im prednost u odnosu na teže svarljive proteine iz nekih drugih izvora (Sousa i sar., 2020).

### 5.1.2.1. Antioksidativna aktivnost proteina lišća nakon digestije

Nakon prolaska kroz digestivni trakt, dejstvom digestivnih enzima dolazi do cepanja proteina na manje peptidne fragmente koji mogu da poseduju različite biološke osobine, i samim tim ostvare pozitivan efekat na ljudsko zdravlje. U skladu sa tim, antioksidativna aktivnost (AA) proteina lišća ispitana je sa ciljem da se utvrdi njihov potencijalni antioksidativni efekat koji bi ispoljili u organizmu nakon varenja.

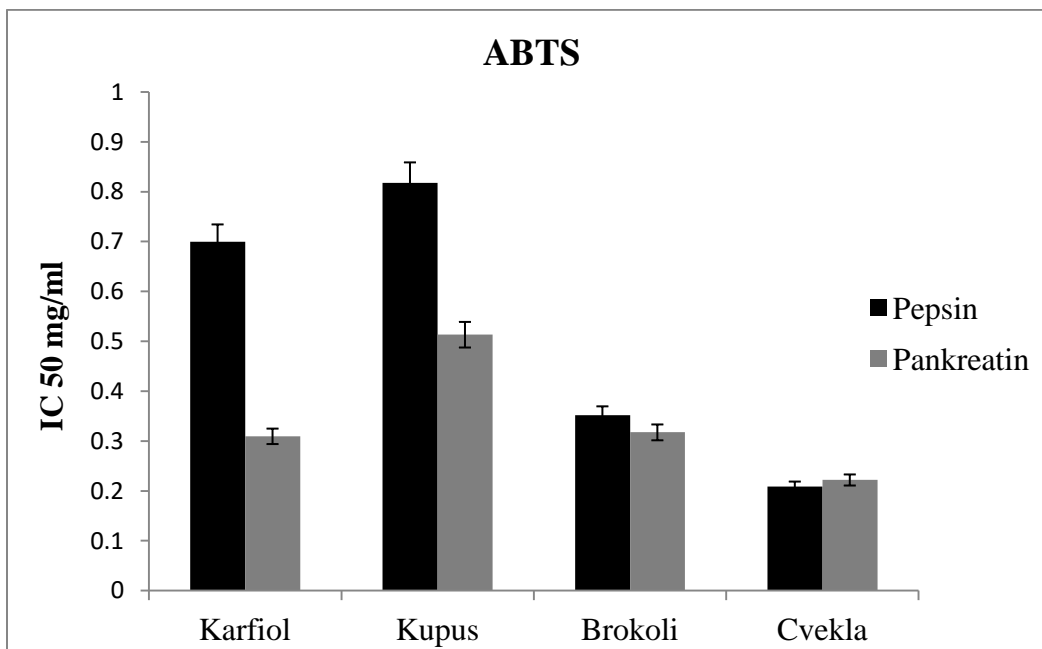
Antioksidativna aktivnost digesta (hidrolizata) dobijenih nakon *in vitro* digestije ispitana je testovima neutralizacije DPPH radikala i ABTS radikal katjona. Dobijena antioksidativna aktivnost za DPPH test izražena je u procentima, dok je za ABTS izražena kao IC<sub>50</sub>. Vrednost IC<sub>50</sub> predstavlja vrednost koncentracije uzorka koja je potrebna za inhibiciju 50% prisutnih radikala. AA ispitana je za digeste sva četiri proteina lišća (karfiola, kupusa, cvekla i brokoli) nakon digestije i pepsinom i pankreatinom, a dobijeni rezultati prikazani su na Slici 22.



Slika 22. Antioksidativna aktivnost (AA%) hidrolizata dobijenih nakon *in vitro* digestije proteina lišća, merena DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metodom

Nakon hidrolize pepsinom, aktivnost uklanjanja DPPH radikala iznosile su 72,9% za protein lišća brokoli, 64,3% karfiola, 77,9% kupusa i 63,25% cvekla. Nakon sledećeg koraka digestije,

aktivnost digesta proteina lišća karfiola i cvekle se nije značajno promenila i iznosi 65.1% i 63,4%, respektivno. Međutim za proteine lišća kupusa i brokolija aktivnost je smanjena, i iznosi 59% i 61%, respektivno. Ovakvo ponašanje aktivnosti, tačnije njen pad nakon faze digestije pankreatinom, može se objasniti time da je DPPH reagens koju se koristi u testu, rastvorljiv u organskim rastvaračima i nije pogodan za vodene rastvore (Popović i sar., 2017). Takođe, bitno je napomenuti da i promena vrednosti pH značajno utiče na rezultate merenja.



*Slika 23. Antioksidativna aktivnost (AA%) hidrolizata dobijenih nakon in vitro digestije proteina lišća, aktivnost uklanjanja radikala merena ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) metodom*

Antioksidativne aktivnosti proteina lišća merene ABTS testom, predstavljene su kao vrednosti IC<sub>50</sub>. Peptički hidrolizati proteina lišća kupusa i karfiola imali su IC<sub>50</sub> vrednosti od 0,81 i 0,699 mg/ml, respektivno. Dalja hidroliza pankreatinom značajno je smanjila IC<sub>50</sub> vrednosti na 0,51 mg/ml za digeste proteina lišća kupusa, i do 0,3 mg/ml za digeste proteina lišća karfiola. IC<sub>50</sub> vrednost za protein lišća brokolija nakon hidrolize pepsinom bio je 0,35 mg/ml i nakon digestije pankreatinom uočeno je blago smanjenje IC<sub>50</sub> na 0,31 mg/ml. IC<sub>50</sub> peptičkog hidrolizata PL cvekle pokazao je najnižu vrednost od 0,21 mg/ml i blago povećanje nakon hidrolize pankreatinom do 0,22 mg/ml.

Prema dobijenim rezultatima za može se reći da hidrolizati proteina lišća poseduju dobru antioksidativnu aktivnost. Ovo je još jedna pozitivna osobina ovih proteina jer je dokazan njihov biološki efekat koji mogu da imaju nakon konzumiranja.

## **5.2. Unapređenje ekstrakcionog prinosa proteina lišća primenom različitih predtretmana**

*U ovom delu disertacije opisan uticaj različitih predtretmana u cilju unapređenja proteinskog prinosa. Proteinima lišća dobijenim ultrazvučnim pretretmanom je određen sadržaj proteina i okarakterisani su u pogledu rastvorljivosti. Takođe, prilagođen je enzimski predtretman za efikasniju ekstrakciju proteina iz lišća primenom celulitičkog i pektolitičkog kompleksa (Viscozyme®L i Vinoxym®), u tri različite koncentracije. Efikasnost enzimskog predtretmana je praćena merenjem ekstrakcionog prinosa proteina. Ovako dobijeni proteini su okarakterisani FTIR spektroskopijom, SDS-PAGE elektroforezom i ispitana im je rastvorljivost i određen aminokiselinski sastav.*

### **5.2.1. Ekstrakcija proteina lista primenom ultrazvučnog predtretmana**

Razvojem koncepta „zelene hemije“, razvijene su brojne nove tehnike za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja, kao što je superkritična ekstrakcija, ekstrakcija uz pomoć mikrotalasa, (kao i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.

Ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka (UZ) predstavlja ključnu tehniku koja može povećati prinos ciljanih bioaktivnih jedinjenja, pojednostaviti manipulaciju sirovinom, skratiti vreme ekstrakcije i povećati produktivnost (Zhang i sar., 2021d; Chen i sar 2020; Qian i sar 2020). Stoga, u ovom radu, ispitan je uticaj ultrazvučnog predtretmana na ekstrakciju proteina iz otpadnog lista karfiola, brokolija, kupusa i cvekle. U Tabeli 8, predstavljen je sadržaj proteina u izolovanim proteinima lišća kao i ekstrakcioni prinos proteina.

	<i>Proteini lišća dobijeni primenom UZ pretretmana</i>			
<i>Parametar</i>	<i>Karfiol</i>	<i>Brokoli</i>	<i>Kupus</i>	<i>Cvekla</i>
<i>Sadržaj proteina(%)</i>	60,44±0,21 <sup>a</sup>	60,08±1,00 <sup>a</sup>	61,26±2,57 <sup>a</sup>	44,59±1,34 <sup>b</sup>
<i>Proteinski ekstrakcioni prinos (%)</i>	14,76±0,46 <sup>b</sup>	17,33±0,81 <sup>c</sup>	9,47±0,08 <sup>d</sup>	7,10±0,11 <sup>e</sup>

*Tabela 8. Sadržaj proteina u izolovanim proteinima lišća primenom ultrazvučnog pretretmana pre alkaline ekstrakcije proteina, kao i ekstrakcioni prinos proteina*

Prema Tabeli 8 najmanji sadržaj proteina ima protein lišća cvekle, dok su sadržaji za protein lišća karfiola, brokolija i kupusa imaju približno isti sadržaj proteina, oko 60%. Dok proteinski ekstrakcioni prinos kreće se u rasponu od 17,3% - 7,10%, najveći je za protein lišća brokolija, a najmanji za protein lišća cvekle. Može se reći da je ultrazvučin predtretman imao podjednak uticaj na lišće karfiola, kupusa i brokolija po sadržaju proteina, dok se razlikuje kod lišća cvekle.

Poređenjem ovih rezultata sa rezultatima dobijenim ekstrakcijom bez predtretmana prikazanim u prethodnom poglavlju (Tabela 5), vidi se da je sadržaj proteina značajno manji za karfiol, cveklu i kupus, dok za brokoli ultrazvuk dovodi do povećanja sadržaja proteina. Međutim, interesantno je to da je kod uzoraka dobijenih ultrazvučnim predtretmanom značajno uvećan proteinski ekstrakcioni prinos kod lišća karfiola i brokolija, dok kod lišća kupusa nije (Tabela 8).

Efekat ultrazvučnog predtretmana pre alkaline ekstrakcije se može pripisati kavitaciji mehurića koja olakšava narušavanje ćelijske membrane i posledično dovodi do lakšeg oslobađanja proteina. Međutim, u ovom slučaju može se zaključiti da primena ultrazvučnog pretretmana nije odgovarajući za sve tipove sirovina, i samim tim može da dovede do denaturacije proteina.

Međutim, rezultati za protein lišća karfiola dobijeni od strane Yang i sar., (2017) pokazuju da primenom ultrazvučnog pretretmana značajno dolazi do povećanja sadržaja proteina (72%) i proteinskog ekstrakcionog prinosa (53%), i oni su znatno viši u odnosu na rezultate proteina lišća karfiola koji su prikazani u Tabeli 8. Poređenjem sa drugim izvorima dobijeni sadržaj proteina je sličan vrednostima koji su opisali Hojila-Evangelista i sar., (2016) za lišće lucerke (60%).

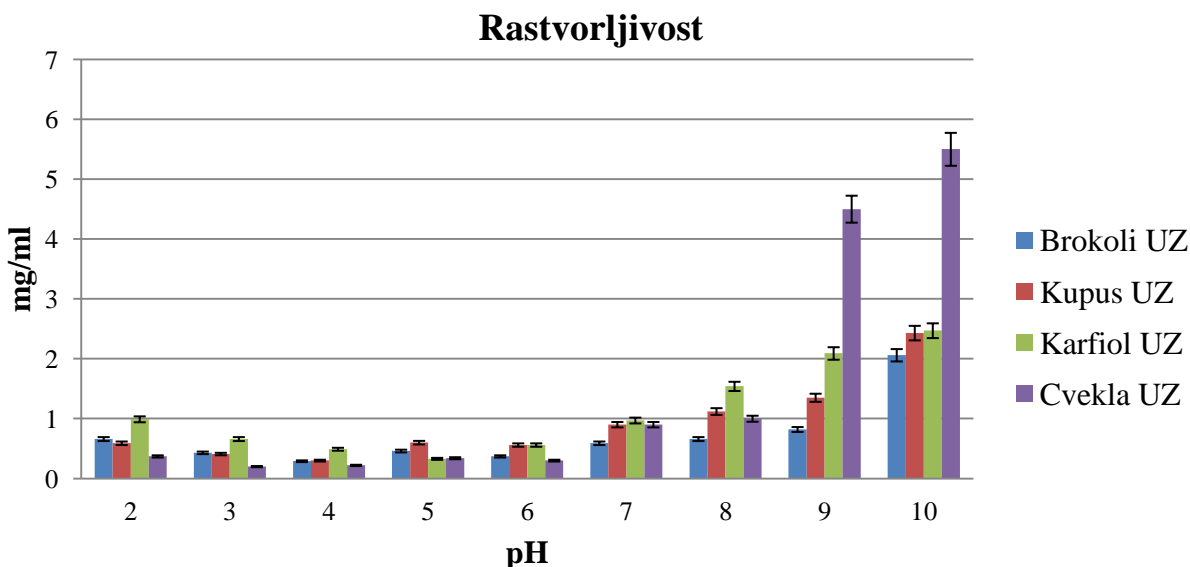


### 5.2.1. 1. Funkcionalne osobine proteina lišća dobijenih ultrazvučnim predtretmanom

Rastvorljivost, kao jedna od najvažnijih funkcionalnih osobina koja utiče na sve ostale osobine je takođe ispitana i kod proteina lišća dobijenih primenom ultrazvučnog pretretmana u cilju utvrđivanja efikasnosti predtretmana na poboljšanje funkcionalnih osobina.

#### 5.2.1.1.1. Rastvorljivost

Rastvorljivost proteina lišća primenom ultrazvučnog predtretmana (UZ) karfiola, kupusa, brokolija i cvekle u opsegu pH vrednosi od 2 – 10 prikazana je na Slici 24.



Slika 24. Rastvorljivost proteina lišća brokolija, cvekle, karfiola i kupusa dobijenih ultrazvučnim pretretmanom

Svi ekstrahovani uzorci proteina lišća pokazali su međusobno sličan trend rastvorljivosti u funkciji od pH. Rezultati pokazuju da je najveća rastvorljivost za protein lišća pri pH 10, među kojima se ističe protein lišća cvekle (5,5 mg/ml), zatim karfiola (2,47 mg/ml), kupusa (2,43 mg/ml) i brokolija (2,09 mg/ml). Sa Slike 24 može se primetiti da je rastvorljivost za sve uzorke skoro ista u opsegu pH 2 – pH 6, a minimalna rastvorljivost je između pH 4 – 6 (0,3 mg/ml – 0,5 m/ml). Slično tome, najniža rastvorljivost proteina Mung pasulja je u opsegu pH 4 – 5 (Du i sar.,

2018), kao i najmanja rastvorljivost za protein lišća lucerke uočava se u kiseloj sredini, dok je ona najveća u alkalnoj sredini (Hojilla-Evangelista i sar., 2016). Za razliku od rastvorljivosti uzoraka koji su su dobijeni klasičnom alkalnom ekstrakcijom (Slika 18) može se reći da je rastvorljivost proteina lišća primenom ultrazvučnog predtretmana daleko niža u alkalnoj sredini, što ukazuje na to da ultrazvučni predtretman nije doveo do poboljšanja funkcionalnih osobina, već je doveo do promena (denaturacije) proteina koji se odražavaju na manju rastvorljivost ovih uzoraka.

### 5.2.1.2. Unapređenje proteinskog prinosa primenom enzimskog predtretmana

Kao što je već rečeno u ovoj podcelini disertacije biće opisana efikasnost enzimskog predtretmana pri ekstrakciji proteina primenom različitih koncentracija enzimskog kompleksa celulitičkih i pektolitičkih enzima (Viscozyme<sup>®</sup>L i Vinozyme<sup>®</sup>). U ispitivanju primene enzimskog predtretmana izabrano je samo lišće karfiola i brokolija zbog njihove kompleksne strukture (celuloze i pektina).

#### 5.2.1.2.1. Hemijski sastav

Za ova ispitivanja korišćene su sirovine koje potiču sa drugog lokaliteta. Hemijski sastav korišćenog lišća je predstavljan u Tabeli 9.

<i>Hemijski sastav</i>		
<i>Uzorak</i>	<i>List karfiola</i>	<i>List brokolija</i>
<i>Vlaga (%)</i>	85,68±0,30	85,43±0,06
<i>Ukupna suva materija</i>	14,26±0,34	14,54±0,67
<i>*Pepeo(%)</i>	15,82±0,06	16,95±0,29
<i>*Sadržaj proteina (%)</i>	31,00±1,32	30,67±0,57
<i>*Masti (%)</i>	1,73±0,07	0,63±0,03
<i>*Ukupni šećeri (%)</i>	51,43±0,68	51,75±0,63
<i>*g/100g suve materije</i>		

*Tabela 9. Hemijski sastav lišća karfiola i brokolija*

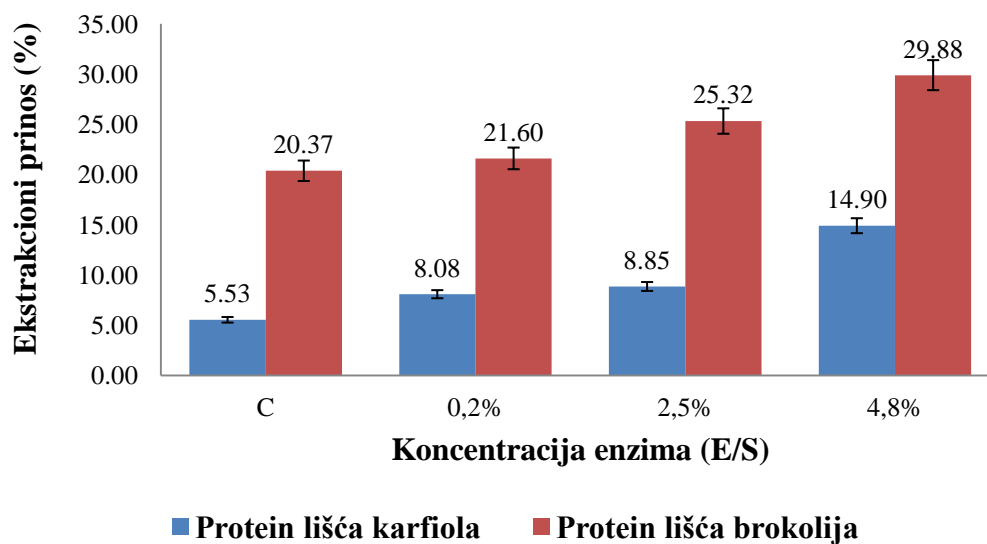
Na osnovu prikazanih rezultata vidi se da je procenat vlage u svežem lišću karfiola i brokolija bio oko 85%, što je u skladu sa podacima opisanim u literaturi (Yang Xu i sar., 2017). Takođe, u Tabeli 9 je prikazano da je sadržaj proteina za lišće karfiola i brokolija oko 31%, što je približno literaturnim podacima (Tenorio i sar., 2018) koji tvrde da je sadržaj proteina u lišću uglavnom između 16 i 29%. Dobijeni sadržaj proteina je veći od onih koji su zabeleženi kod lišća *jackfruita* (24,06%) (Chalredon i sar., 2021) lucerke (25,75%) (Zhengjun Xie i sar., 2008), šećerne repe (24,02%) (Ayça Akyüz i Seda, 2021), a blizak onima opisanim za lišće *Moringu Olefira* 28,7% (Teixeira i sar., 2014) i 31,4% (Nouman i sar., 2016). Međutim, veoma je važno napomenuti da hemijski sastav, a posebno sadržaj proteina u listovima varira među naučnim studijama. To se dešava usled različitih geografskih regiona odakle potiču biljne vrste a značajan uticaj ima i klima, vremena žetve i razlike između sortnih vrsta i karakteristika poljoprivrednog gajenja.

#### **5.2.1.2.2. Uticaj koncentracije enzimskog kompleksa na ekstrakcioni prinos proteina**

U prethodnom poglavlju je prikazano da su prinosi ekstrakcije proteina za lišće brokolija i karfiola bili prilično niski, što smanjuje potencijal za primenu na industrijskom nivou (Sedlar i sar., 2020). Zbog toga ovaj proces ekstrakcije je unapređen primenom enzimskog predtretmana pre alkalne ekstrakcije radi poboljšanja oslobađanja proteina iz biljnih ćelija. Prema Nadar i sar., (2018) ćelijski zid biljne ćelije sastoji se od složene strukture, usled čega je ekstrakcija proteina znatno otežana. Celuloza, hemiceluloza, pektin i glikoproteini formiraju strukturnu mrežu oko proteina i otežavaju njihovo oslobađanje, što daje niske prinose proteina (Ayça Akyüz i Seda, 2021).

Ispitan je uticaj enzimskog postupka kao predtretmana alkalnoj ekstrakciji proteina iz lišća karfiola i brokolija. U postupku ekstrakcije primenjen je enzimski kompleks koji se sastoji od kombinacije dve vrste enzimskih preparata Viscozyme<sup>®</sup>L (celulitički) i Vinozyme<sup>®</sup> (pektolitički). Enzimski kompleks je primenjen u tri različite koncentracije enzim-supstrat (E/S) odnosa (0,2%, 2,5% i 4,8% Viscozyme<sup>®</sup>L zajedno sa 0,2%, 2,5% i 4,8% Vinozyme<sup>®</sup>). Istovremeno je izvedena ekstrakcija bez prisustva enzima kao kontrolni uzorak.

Na Slici 25 predstavljeni su ekstrakcioni prinosi proteina lišća karfiola i brokolija dobijenih postupkom enzimske ekstrakcije proteina:



Slika 25. Ekstrakcioni prinos proteina lišća karfiola i brokolija za kontrolne uzorke 0% (C) i nakon enzimske ekstrakcije u tri različita E/S odnosa (0,2%, 2,5% i 4,8%)

Prema Slici 25, efikasnost enzimskog predtretmana u direktnoj je korelaciji sa primenjenom količinom enzimskog kompleksa, čime se postiže najveći prinos proteina, za oba biljna izvora, sa odnosom E/S od 4,8%. Inicijalni prinosi proteina su veoma niski (5,53% za protein lišća karfiola i 20,3% za protein lišća brokolija), pri čemu je nakon povećanja koncentracije enzima efikasnost enzimskog predtretmana povećana za 10% (15% za protein lišća karfiola, 30% za protein lišća brokolija) za oba izvora. Poboljšanje prinosa ekstrakcije proteina posledica je celulitičke i pektolitičke aktivnosti primenjenih enzima (Shima i sar., 2021). Dezintegracija ćelijskog zida čini (obezbeđuje) intracelularne materijale pristupačnijim za ekstrakciju, a efikasnost enzimskog predtretmana se više odrazila na uzorke brokolija, gde je postignut veći ekstrakcioni prinos. Slični rezultati ekstrakcije proteina kao i za otpadno lišće karfiola uočeni su i kod listova Moringa Oliefira (14,2%) (Teixeira i sar., 2014) nakon optimizacije parametara enzimske ekstrakcije. Ipak, prikazani rezultati su niži od prinosa proteina koji su postignuti za lišće šećerne repe (Ayça Akyüz i Seda, 2021), gde je efikasnost povećana za 43,27% sa primenom enzimskog predtretmana u procesu ekstrakcije proteina.

Sadržaji proteina u dobijenim proteinima lišća karfiola i brokolija pri različitim E/S odnosima kao i u kontrolnim uzorcima 0% prikazani su u Tabeli 10.

	<i>Koncentracija enzimskog kompleksa</i>			
<i>Proteini lišća</i>	<i>Kontrola 0%</i>	<i>E/S 0,2%</i>	<i>E/S 2,5%</i>	<i>E/S 4,8%</i>
<i>Karfiol</i>	53,81±0,29	48,23±0,55	66,36±0,12	77,27±0,14
<i>Brokoli</i>	52,63±0,41	52,03±0,43	63,46±1,07	84,66±0,51

*Tabela 10. Sadržaj proteina u proteinima lišća dobijenim enzimskom ekstrakcijom pri različitim E/S odnosima enzimskog kompleksa (0,2%, 2,5%,4,8%) iu kontrolnim uzoracima 0%*

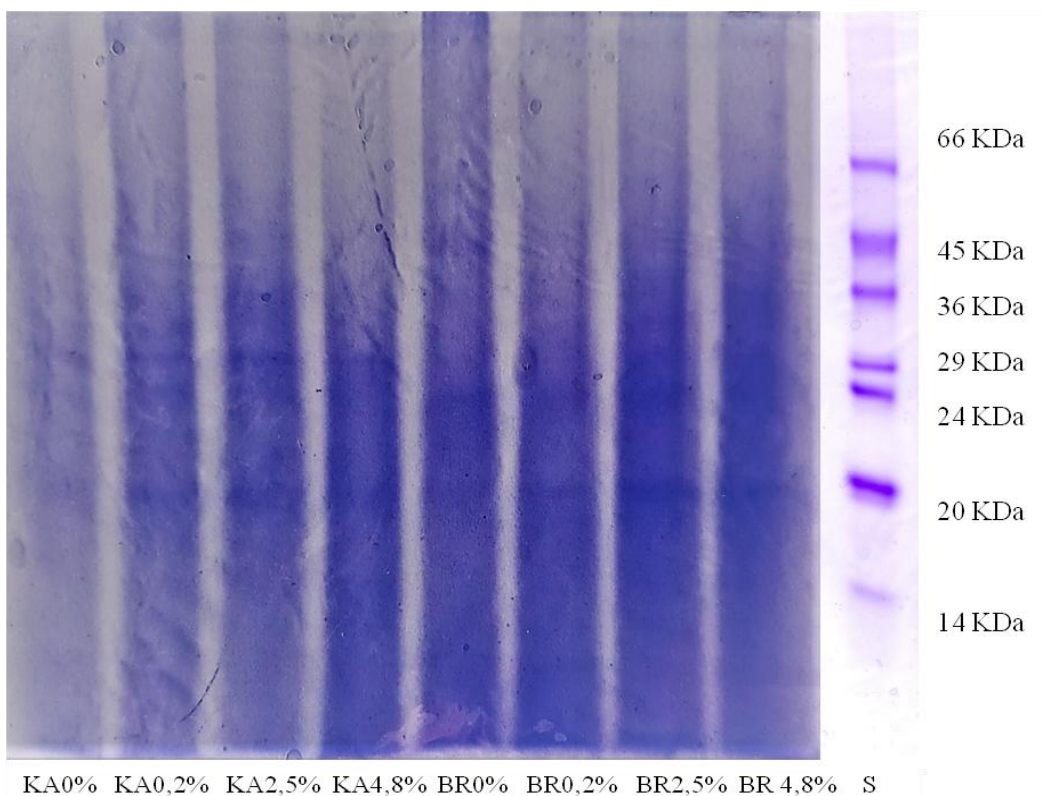
Sadržaj proteina za karfiol pri E/S odnosu 4,8% je 77,27%, a za list brokolija je 84,66%. Može se zaključiti da je pri najvećem E/S odnosu 4,8% najveći sadržaj proteina u oba izvora. Vrednosti za sadržaj proteina za lišće karfiola dobijen pri E/S odnosu 4,8%, uvećan je za 23%, a sadržaj za lišće brokolija uvećan je za 32% u odnosu na kontrolu. Dakle, može se zaključiti da celulitički i pektolitički kompleks enzima Viscozyme<sup>®</sup>L i Vinozyme<sup>®</sup> značajno utiče na povećanje ekstrakcionog prinosa proteina i sadržaja proteina i kod karfiola i brokolija i da je navisi pri E/S odnosu 4,8%. Što znači da je ova koncentracija enzima dovoljna da dovode do značajne dezintegracije ćelijskog zida lišća i karfiola i brokolija pa samim tim dovodi i do olakšane ekstrakcije proteina.

### **5.2.1.2.3. Karakterizacija proteina lišća dobijenih enzimskim pretretmanom**

U cilju praćenja efikasnosti enzimskog pretretmana pri ekstrakciji proteina lišća karfiola i brokolija izvršena je i karakterizacija proteina primenom SDS-elektroforeze i FTIR spektrometrije.

### 5.2.1.3.1. SDS-elektroforeza

Elektroforetski profil svih proteina lišća dobijenih ekstrakcijom uz pomoć enzima, kao i kontrolnih uzoraka, prikazani su na Slici 26. Uočeno je da su polipeptidne trake imale veći intenzitet u uzorcima dobijenim sa većim E/S odnosom, posebno pri 4,8% E/S, gde je intenzitet bio najveći za oba izvora (linija KA4,8% i linija BR4,8%), takođe prateći porast procenata njihovog ekstrakcionog prinos proteina. Ovo ukazuje na to da koncentracija enzima E/S 4,8% može dovesti do efikasnije dezintegracije ćelijskog zida i na taj način pomoći oslobađanju veće količine proteina. Prema Slici 26, ovaj enzimski uticaj se najviše odražava na protein lišća brokolija, gde su polipeptidne trake imale najveći intenzitet.



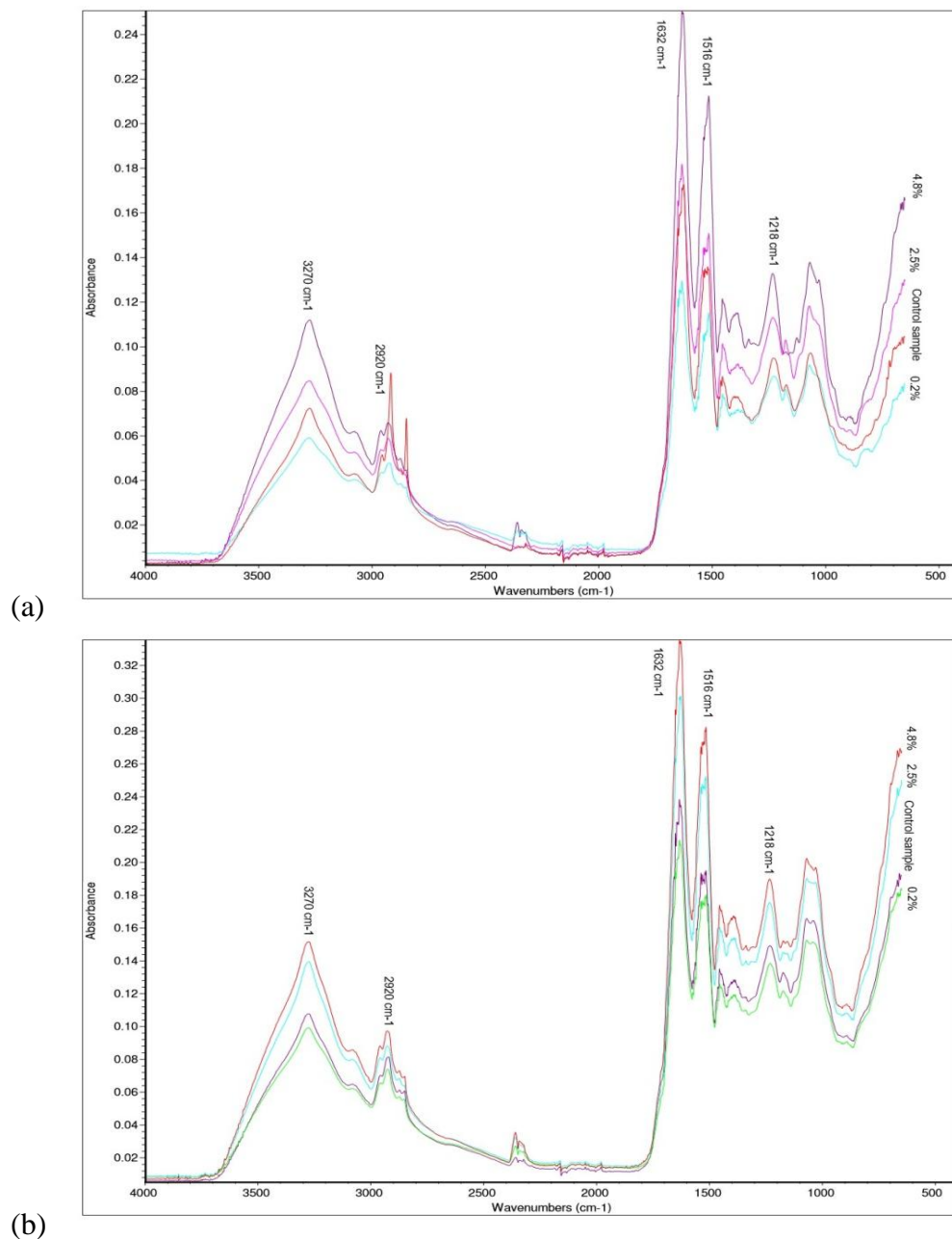
*Slika 26. SDS-PAGE profili proteina lišća karfiola i brokolija dobijenih primenom različitih koncentracija enzimskog kompleksa*

Sve uzorke karakteriše prisustvo traka kako manjih tako i većih molekulskih masa. Prisustvo proteinske trake na 20 kDa je zajedničko za sve testirane uzorke, najverovatnije koji pripadaju globulinskoj frakciji proteina, i 14 kDa, koji odgovaraju albuminskoj frakciji proteina. Ovaj

rezultat je u skladu sa prethodnim rezultatima, za proteine lišća karfiola i brokolija koji su dobijeni bez upotrebe predtretmana (Slika 16). Detektovane su i druge proteinske trake koje odgovaraju molekularnoj masi od oko 25 kDa, 30 kDa, 32 kDa i 45 kDa.

#### **5.2.1.3.2. FTIR spektrometrija proteina lišća dobijenih enzimskim predtretmanom**

Kao što je već napomenuto, FTIR predstavlja efikasnu tehniku koja se koristi za procenu sekundarne strukture proteina. Spektri u opsegu od 500–4000  $\text{cm}^{-1}$  korišćeni su za identifikaciju funkcionalnih grupa proteina lišća brokolija i karfiola dobijenih enzimskim predtretmanom. Takođe, FTIR metoda služi i za praćenje uticaja koncentracije primenjenog enzimskog kompleksa. FTIR spektri svih proteina lišća ekstrahovanih korišćenjem različitih koncentracija enzima i kontrolnih uzoraka prikazani su na Slici 27.



Slika 27. FTIR spektri (a) proteina lišća brokolija i (b) proteina lišća karfiola dobijenih primenom različitih koncentracija E/S odnosa pri ekstrakciji proteina

Karakteristična infracrvena apsorpciona traka ovih proteina uglavnom uključuje amid A ( $3270\text{ cm}^{-1}$ ), amid B ( $2920\text{ cm}^{-1}$ ), amid I ( $1632\text{ cm}^{-1}$ ), amid II ( $1516\text{ cm}^{-1}$ ), i amid III strukture ( $1218\text{ cm}^{-1}$ ). Amid A struktura je često povezana sa vibracijama istezanja amino grupa i vodoničnih veza na polipeptidu, obično na talasnoj dužini od  $3000\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$  [30], a amid B sa pikovima u oblasti  $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  koje nastaje usled adsorpcije rastezanja C – H veze



(Secundo i sar., 2005). Amid I, II i III su veoma korisni u razumevanju sekundarne strukture proteina. Amid I struktura je rezultat vibracije istezanja karbonilne grupe, dok je amid II struktura rezultat vibracije istezanja amino grupe. U poređenju sa proteinima lišća koji su dobijeni bez predtretmana (Slika 17), može se reći da poseduju skoro isti apsorpcioni spektar proteina kao i proteini dobijeni primenom enzimskog pretretmana, i da dolazi do podudarnosti između karakterističnih apsorpcionih traka na istom opsegu talasnih dužina spektra.

Kako se koncentracija E/S odnosa povećavala, karakteristični pikovi amida A, amida B, amida I, II, III pokazivali su veće apsorpcione brojeve. Iste veze imaju jači intenzitet apsorpcije pri većim E/S odnosima, verovatno zbog značajnijeg broja istih veza prisutnih u proteinima lista. I spektri proteina lišća brokolija i karfiola spektri pokazali su izuzetak sa E/S odnosom od 0,2%, koji ima nižu vrednost apsorpcije pika od kontrole, što je posledica manjeg sadržaja proteina. Međutim, spektri oba proteina lista dobijeni sa odnosom E/S od 4,8% imaju najveću apsorpcionu vrednost, što je skladu sa njihovim prinosom ekstrakcije.

#### **5.2.1.4. Aminokiselinski sastav proteina lišća dobijenih enzimskom ekstrakcijom**

Nutritivna vrednost proteina određena je sadržajem aminokiselina kao i fiziološkog iskorišćenja aminokiseline nakon apsorpcije, varenja i minimalnih stopa oksidacije. Stope oksidacije aminokiselina su relativno niske sve dok njihova utrošena količina ne premaši količinu potrebnu za sintezu proteina (Friedman et al., 1996). Dostupnost aminokiselina varira u zavisnosti od tretmana obrade, izvora proteina i interakcija sa drugim komponentama matriksa hrane.

Osnovni koncept *esencijalnosti* aminokiselina predstavlja temelj za sve metode procene kvaliteta proteina. Aminokiseline se dele na osnovu njihove relativne ili apsolutne brzine sinteze proteina *in vivo*:

- (a) *esencijalne*: valin, triptofan, treonin, fenilalanin, metionin, lizin, leucin, izoleucin i histidin;
- (b) *uslovno neesencijalne*: tirozin, cistein i arginin;
- (c) *neesencijalne*: serin, prolin, glicin, glutaminska kiselina, glutamin, asparaginska kiselina, asparagin i alanin (Volpi, Kobaiashi, Sheffield-Moore, Mittendorfer, i Volfe, 2003).

Esencijalne aminokiseline se ne mogu sintetisati u ljudskom organizmu pa se moraju unositi isključivo putem ishrane. Unos ovih kiselina putem hrane nadoknađuje telesni gubitak azota i

održavanje proteinske mase, pruža strukturnu i funkcionalnu osnovu za održavanje i rast organizma. Nutritivni kvalitet takođe zavisi od odnosa i koncentracije sastavnih aminokiselina koje čine protein. Što je veći odnos esencijalnih aminokiselina, veći je kvalitet ili biološka vrednost proteina. Takođe, zastupljenost određene aminokiseline u proteinu takođe ima veliki značaj za procenu kvaliteta proteina.

Količina proteina koja je neophodna da zadovolji potrebe u ljudskoj ishrani preporučena je odgovarajućim vodičima (WHO/FAO/UNU Expert Consultation 2007). Preporučeni unos proteina za zdravu odraslu osobu koja ima minimalnu fizičku aktivnost je 0,8 g proteina/kg telesne

težine na dnevnom nivou. Aminokiselinski sastav proteina lišća karfiola i proteina lišća brokolija, dobijenih nakon enzimskog predtretmana pri odnosu E/S od 4,8%, i u kontrolnim uzorcima prikazan je u Tabeli 11. Može se zaključiti da je ukupna aminokiselinska kompozicija povećana kod oba izvora proteina primenom enzimskog predtretmana. Kod proteina lišća karfiola iznosi 48% dok kod proteina lišća brokolija 44,5%. Najzastupljenija aminokiselina je asparaginska kiselina u svim uzorcima, zatim leucin koja je jedna od esencijalnih aminokiselina razgranatog lanca neophodna za formiranje hemoglobina dok su u najmanjem sadržaju prisutni prolin i cistein.

Količina esencijalnih aminokiselina kao procenat ukupnog sadržaja aminokiselina je iznad 40% za sve uzorke (za enzimski protein lišća karfiola - 42,60% a za enzimski protein lišća brokolija - 43,62%). Takođe, odnos esencijalnih prema neesencijalnim amino kiselinama prelazi vrednost od 0,6 (0,65 - 0,78). Oba posmatrana parametra su bila iznad standardnih vrednosti koje preporučuje FAO/WHO 2007. Slični rezultati u literaturi opisani su takođe za proteine izolovane iz otpadnog lišća karfiola, gde je zastupljenost esencijalnih amino kiselina 43,25% u odnosu na ukupni sadržaj aminokiselina, a odnos esencijalnih aminokiselina prema neesencijalnim aminokiselinama bio 0,76. (Yang Xu i sar., 2017)

Jedno od glavnih ograničenja za upotrebu biljnih proteina u ljudskoj ishrani je njihov neizbalansiran aminokiselinski sastav ref. Stoga, uprkos njihovim razlikama u sadržaju aminokiselina, potrebno je istaći da se sve vrste ispitanih proteina lišća (Tabela 11) prema WHO/FAO/UNU Expert Consultation 2007 mogu da posluže kao visokokvalitetan izvor

proteina i mogli bi značajno doprineti uravnoteženoj ishrani. Takođe, može se reći da lišće koje predstavlja otpad nakon uzgoja i branja karfiola i brokolija predstavljaju alternativni izvor koji može da zadovolji potrebe za proizvodnju prehrambenih proizvoda sa izbalansiranim aminkiselinskim sastavom.

<i>g/100g LP</i>	<i>Kontrola proteina (lišće karfiola )</i>	<i>Enzimski tretman (lišće karfiola)</i>	<i>Kontrola proteina (lišće brokolija)</i>	<i>Enzimski tretman (lišće brokolija)</i>
<i>Treonin (The)*</i>	2,25	3,60	2,69	3,55
<i>Valin (Val)*</i>	3,02	3,87	3,57	3,60
<i>Metionin (Met)*</i>	1,13	1,16	1,05	0,85
<i>Izoleucine (Ile)*</i>	2,60	3,40	3,14	3,41
<i>Leucin (Leu)*</i>	3,66	4,15	4,12	3,82
<i>Fenilalanin (Phe)*</i>	nd	nd	nd	nd
<i>Histidin (His)*</i>	1,26	1,18	1,30	1,26
<i>Lizin (Lys)*</i>	2,92	3,11	0,016	2,94
<i>Triptofan (Trp)*</i>	no	no	no	no
<i>Asparaginska kiselina (Asp)</i>	4,73	6,83	5,43	6,19
<i>Serin (Ser)</i>	1,92	3,12	2,16	2,88
<i>Glutaminska kiselina (Gln)</i>	3,24	3,52	3,78	3,56
<i>Proline (Pro)</i>	0,32	0,07	0,13	0,02
<i>Glicin (Gly)</i>	2,77	3,46	3,07	3,19
<i>Alanin (Ala)</i>	2,70	3,06	2,71	2,76
<i>Cistein (Cys)</i>	0,11	0,13	0,12	0,26
<i>Tirozin (Tyr)</i>	2,43	4,26	3,28	3,29
<i>Arginin (Arg)</i>	3,13	3,13	3,68	2,96

<i>g/100g LP</i>	<i>Kontrola proteina (lišće karfiola )</i>	<i>Enzimski tretman (lišće karfiola)</i>	<i>Kontrola proteina (lišće brokolija)</i>	<i>Enzimski tretman (lišće brokolija)</i>
<i>Ukupne amino kiseline (TAA)</i>	38,19	48,05	40,25	44,54
$\Sigma EAA^*$	16,84	20,47	15,88	19,43
$\Sigma NEAA$	21,35	27,58	24,37	25,11
$\Sigma EAA / \Sigma NEAA$	0,78	0,74	0,65	0,77

*Tabela 11. Aminokiselinski sastav proteina lišća karfiola i brokolija dobijenih enzimskom ekstrakcijom pri E/S odnosu 4,8%, zajedno sa kontrolnim uzorcima (g/100g LP)*

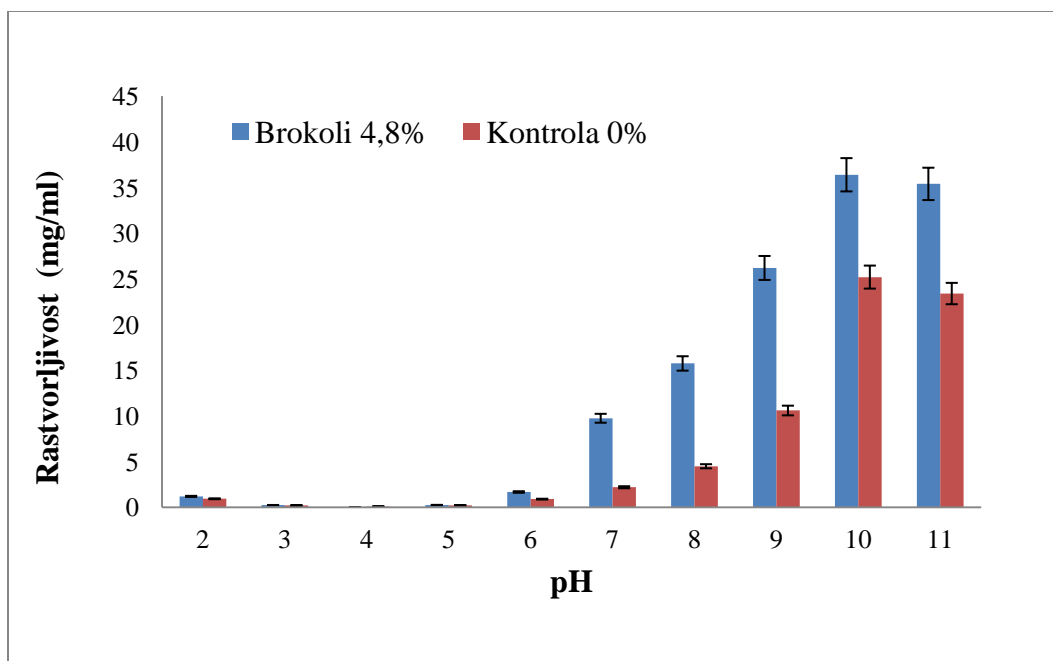
*no: nije određivan, nd: nije detektovan, \*esencijalne aminokiseline,  $\Sigma EAA^*$ : Ukupni sadržaj esencijalnih aminokiselina,  $\Sigma NEAA$ : Ukupan sadržaj neesencijalnih aminokiselina,  $\Sigma EAA / \Sigma NEAA$  : odnos esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina*

### **5.2.1.5. Funkcionalne osobine proteina lišća dobijenih enzimskim pretretmanom**

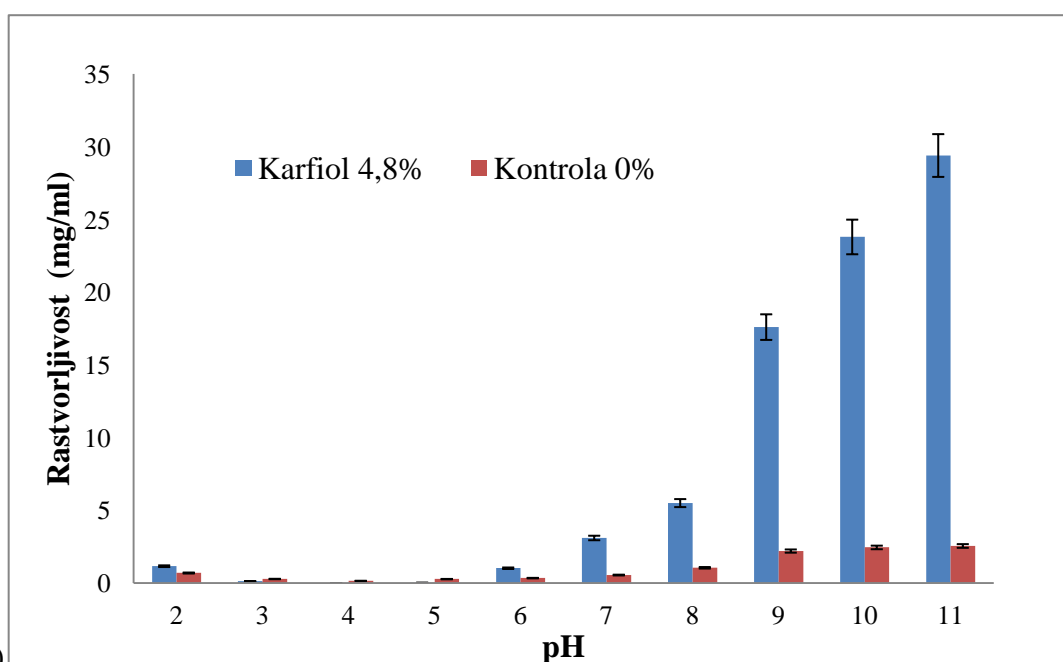
Rastvorljivost, kao jedna od najvažnijih funkcionalnih osobina ispitana je kod proteina lišća primenom enzimskog pretretmana, sa ciljem praćenja unapređenja ove funkcionalne osobine.

#### **5.2.1.5.1. Rastvorljivost proteina lišća dobijenih enzimskom ekstrakcijom**

Rastvorljivost proteina je određena za sve uzorke proteina lišća dobijene sa različitim E/S odnosima koji se koriste u ekstrakciji uz pomoć enzima. Međutim, najveću rastvorljivost su pokazali proteini lišća dobijeni sa koncentracijom enzima pri odnosu E/S 4,8%. Njihov pH profil rastvorljivosti (pH 2 - pH 11) prikazan je na Slici 28.



(a)



(b)

Slika 28. Profil rastvorljivosti proteina lišća dobijenih enzimskom ekstrakcijom (a) lišća brokolija 4,8% i kontrolnog uzorka 0% (b) lišća karfiola 4,8% i kontrolnog uzorka 0%

Generalno, rastvorljivost je veća u alkalnoj nego u kiseljoj sredini gde se minimalna rastvorljivost javlja između pH 2 - 6. Dalje, rastvorljivost proteina lišća pokazala je linearni porast u alkalnoj sredini (pH 8 – pH 11), što je slično literaturnom izveštaju o rastvorljivosti proteina lišća lucerke (Hadidi i sar., 2020) štaviše, došlo je do značajnog poboljšanja u poređenju sa kontrolnim

uzorkom. Najveća rastvorljivost za protein lišća brokolija 4,8% je na pH 10 i iznosi 36,4 mg/ml, a za protein lišća karfola 4,8% je na pH 11 i iznosi 29,4 mg/ml, a čak je 10 puta veća u poređenju sa kontrolnim uzorkom (2,55 mg/ml). Može se zaključiti da su veće koncentracije enzima pokazale bolje rezultate u rastvorljivosti proteina lišća, što može da dovede do poboljšanih funkcionalnih osobina u smislu emulgovanja, formiranja pene ili želiranja (Manoji i sar., 2021). U poređenju sa prethodnim rezultatima (Slika 18), rastvorljivost proteina lišća karfiola i brokolija je značajno veća u alkalnoj sredini, dok u kiselj sredini ne postoji bitna razlika u rezultatima. Takođe, u odnosu na rastvorljivost proteina lišća karfiola i brokolija dobijenih ultrazvučnim predtretmanom (Slika 24), može se reći da je došlo do značajnog povećanja rastvorljivosti u alkalnoj sredini. Jedan od razloga za bolju rastvorljivost generalno, može se objasniti time da enzimski predtretman nije narušio inicijalnu strukturu proteina zbog blagih uslova u kojima deluje (Maryam i sar., 2021), a drugi je pozitivna korelacija između prinosa proteina i rastvorljivosti.

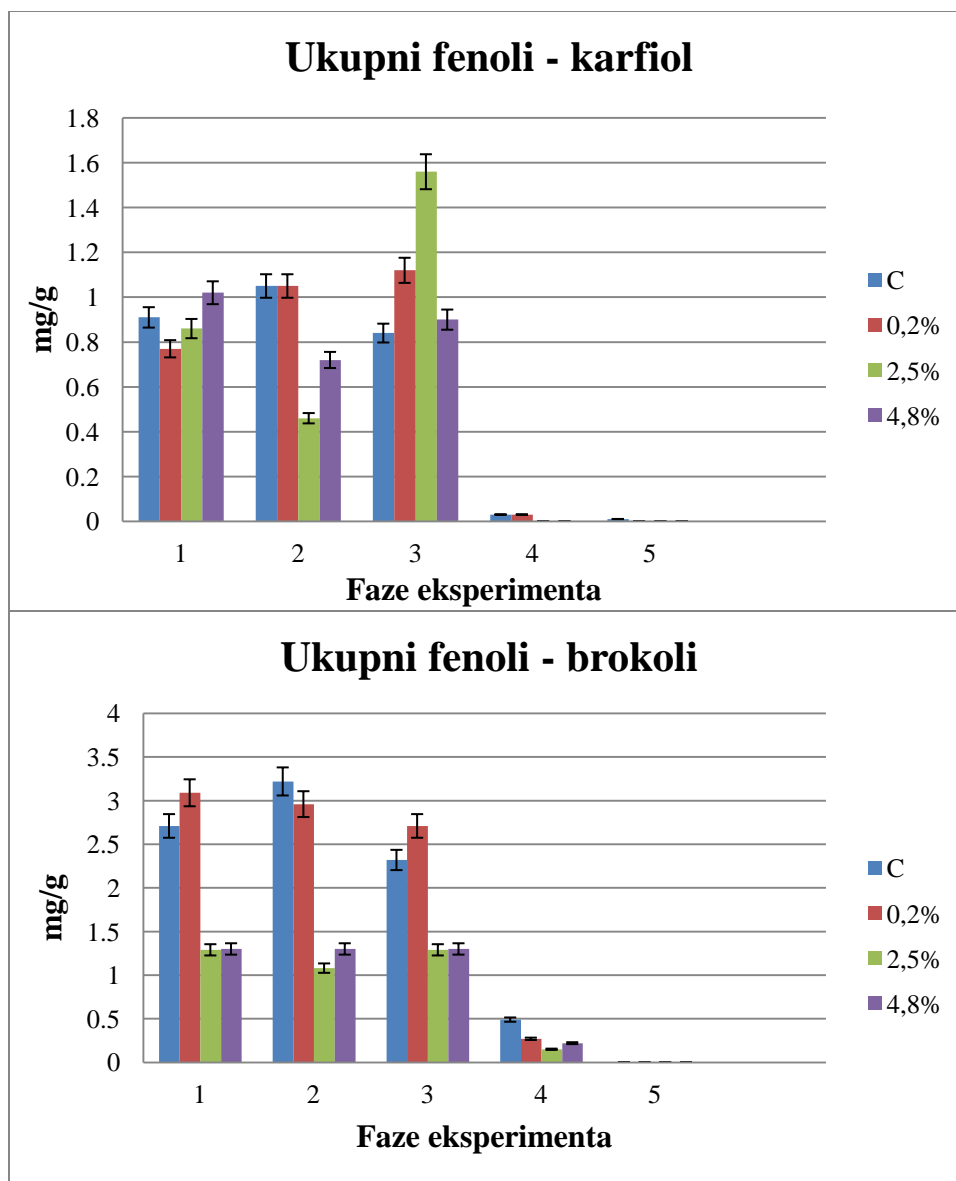
#### **5.2.1.6. Određivanje sadržaja ukupnih fenola kao parametra za praćenje čistoće proteina**

Funkcionalnost proteina u velikoj meri određena je njihovom rastvorljivošću, čistoćom uzorka i vezanim polifenolima, koji su obično uzročnici problema koji se tiču tamne boje, nepovoljnog ukusa i slabe svarljivosti, upravo zbog formiranja kompleksa polifenol – protein.

U ovom radu određivanje sadržaja ukupnih fenola poslužilo je za određivanje stepena prečišćenosti proteina. Sam postupak dobijanja je podeljen u 5 faza: Faza 1 - primena enzimskog predtretmana lišća, Faza 2 - alkalna ekstrakcija proteina na pH 10 - 11, Faza 3 - taloženje proteina na pH 4, Faza 4: dekantovanje supernatanta i ponovno rastvaranje taloga na pH 10-11 a zatim ponovno taloženje proteina na pH 4, Faza 5 – dekantovanje supernatanta i ponovno rastvaranje taloga na pH 10-11 a zatim ponovno taloženje pH 4.

Ukupni fenoli su određeni u svakoj od ovih fazi i prikazani su na Slici 29.

Generalno, sa Slike 29 jasno se može videti da se u fazama 4 i 5 (faze prečišćavanja) sadržaj ukupnih fenola drastično smanjuje, što ukazuje na to da je protein u velikoj meri oslobođen slobodnih fenolnih komponenata .



Slika 29. Sadržaj ukupnih fenola u različitim fazama enzimske ekstrakcije proteina iz lišća karfiola i brokolija

Najveći sadržaj ukupnih fenola za list karfiola je u trećoj fazi eksperimenta (nakon taloženja proteina) pri koncentraciji enzimskog kompleksa od 2.5% Viscozyme<sup>®</sup>L i Vinozyme<sup>®</sup> i iznosi 1,56 mg/g lišća, a najveći sadržaj ukupnih fenola za list brokolija je u drugoj fazi ekstrakcije (nakon alkalne ekstrakcije) i pri koncentraciji enzimskog kompleksa od 0.2% Viscozyme<sup>®</sup>L i Vinozyme<sup>®</sup> i iznosi 3,09 mg/g lišća, pri uslovima eksperimenta. Takođe iz Slike 29 može se videti da je količina ukupnih fenola znatno veća kod lista brokolija, nego kod lista karfiola.

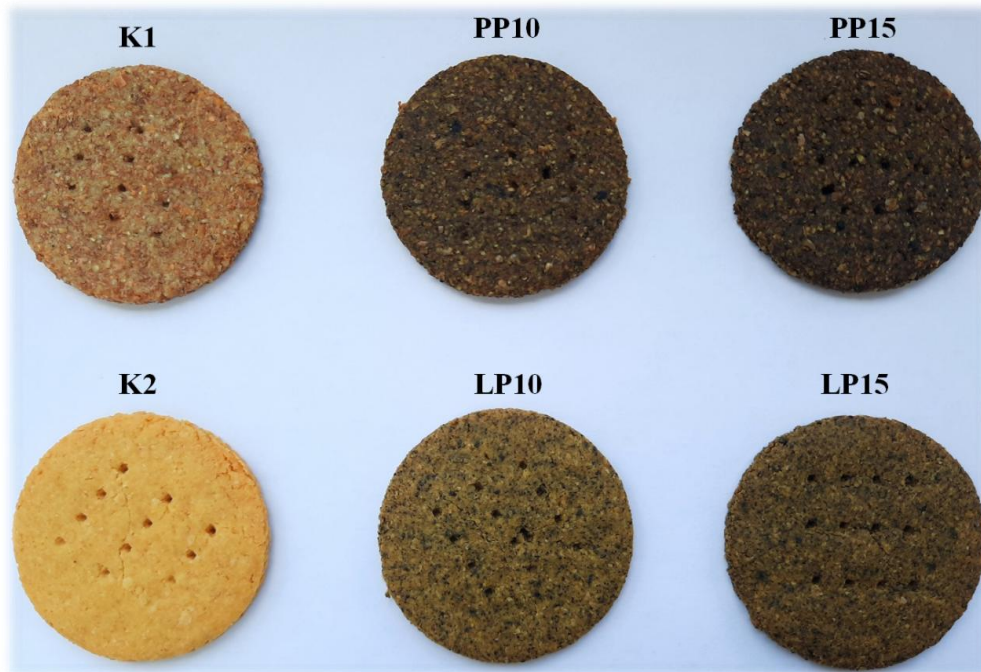


### **5.3. Ugradnja proteina dobijenih iz otpadnog lišća brokolija u prehrambeni matriks**

*U ovom poglavlju doktorske disertacije ispitan je potencijal proteina lišća brokolija kao funkcionalnog sastojka prehranbenog proizvoda. Protein lista brokolija je implementiran u dve formulacije matriksa: glutenski i bezglutenski kreker. Ugradnja proteina u matriks izvršena je u dva nivoa koncentracije, a dobijenim krekerima ispitane su fizicko – hemijske karakteristike, senzorska ocena i ukupna dopadljivost proizvoda. Takođe, ispitana je svarljivost primenom in vitro digestije, a u uzorcima dobijenih hidrolizata određena je antioksidativna aktivnost, kao i sadržaj ukupnih fenola. Takođe, prikazan je i elektroforetski profil uzoraka pre i nakon in vitro digestije ovih inovativnih formulacija.*

U prethodnim poglavljljima opisano je dobijanje proteina iz otpadnog lišća četiri vrste povrća kao i unapređenje metode ekstrakcije radi dobijanja većeg prinosa proteina i većeg sadržaja proteina u samom izolatu. Međutim, kako su ekstrakcioni prinosi i dalje nedovoljni za potrebe ugradnje proteina lišća u prehrambeni matriks, u cilju proizvodnje veće količine upotrebljena je “*scale up*” proizvodnja, primenom poluindustrijskog ekstraktora opisanom u 4. poglavlju ove doktorske disertacije. Kao biljni izvor za ove potrebe odabrano je otpadno lišće brokolija, zbog dobrih funkcionanih karakteristika izolovanog proteina, kao i povoljnih bioaktivnih svojstava nakon *in vitro* digestije što ga čini pogodnim za implementaciju u prehrambeni matriks. Protein lišća brokolija dobijen na ovaj način, ima sadržaj proteina 45%.

Krekeri su formulisani kao glutenski - sa određenim nivoom supstitucije integralnog pšeničnog brašna, i bezglutenski – sa određenim nivoom supstitucije brašna od leblebije sa proteinom lišća brokolija a u cilju dobijanja nutritivno vrednog funkcionalnog proizvoda i odgovarajućih fizicko – hemijskih i senzorskih osobina. Supstitucija je izvršena sa dve različite koncentracije proteina lišća brokolija (Slika 30) 10% (PP10, LP10) i 15% (PP15, LP15), a novokreirani krekeri su poređeni sa kontrolnim uzorkom krekeri sa integralnim pšeničnim brašnom (K1), i brašnom od leblebije (K2) u cilju ispitivanja potencijala inkorporiranih proteina sa nutritivnog i senzorskog aspekta kvaliteta.



*Slika 30. Krekeri integralnog pšeničnog brašna obogaćeni sa proteinom lišća brokolija 10% (PP10), 15% (PP15), i krekeri sa brašnom od leblebije obogaćeni sa proteinom lišća brokolija 10% (LP10), 15% (LP15) zajedno sa kontrolnim uzorcima (K1, K2)*

### 5.3.1. Nutritivni profil kreker

Hemijski sastav kreker sa integralnim pšeničnim brašnom (PP10, PP15) i brašnom leblebije (LP10, LP15) obogaćenih sa proteinom lišća brokolija prikazan je u Tabeli 12.

<i>Parametar</i>	<i>K1</i>	<i>PP10</i>	<i>PP15</i>	<i>K2</i>	<i>LP10</i>	<i>LP15</i>
<i>Vlaga (%)</i>	7,41 ± 0,04	7,01 ± 0,04	7,11 ± 0,07	5,62 ± 0,04	5,44 ± 0,06	5,05 ± 0,05
<i>Pepeo (%)</i>	1,83 ± 0,03	2,38 ± 0,01	2,91 ± 0,00	2,80 ± 0,01	3,34 ± 0,02	3,69 ± 0,01
<i>Masti (%)</i>	13,86 ± 0,11	14,05 ± 0,10	14,67 ± 0,06	17,33 ± 0,05	17,20 ± 0,10	17,05 ± 0,12
<i>Proteini (%)</i>	11,96 ± 0,04	14,35 ± 0,10	16,03 ± 0,08	16,61 ± 0,08	18,56 ± 0,11	19,55 ± 0,04
<i>Vlakna (%)</i>	6,77±0,11	6,09±0,21	5,76±0,09	10,05±0,09	9,12±0,08	8,54±0,12
<i>Ugljeni hidrati (%)</i>	58,17±0,33	56,13±0,25	53,53±0,30	47,60±0,28	46,35±0,36	46,14±0,23
<i>Energetska vrednost (kcal)</i>	419	421	422	433	433	433

*Tabela 12. Hemijski sastav kreker pripremljenih sa integralnim pšeničnim brašnom obogaćenih sa proteinom lišća brokolija (PP10, PP15) zajedno sa kontrolom K1, i sa brašnom leblebije (LP10, LP15) zajedno sa kontrolom K2.*

Na osnovu dobijenih rezultata može se primetiti da se sa povećanjem nivoa supstitucije osnovnog brašna proteinima lišća brokolija smanjuje sadržaj vlage kao i sadržaj ugljenih hidrata. Rezultati vlage kao indirektnog pokazatelja kvaliteta i stabilnosti proizvedenih kreker su u granicama vrednosti koje su prihvatljive za sadržaj vlage za ovu vrstu proizvoda (14 g/100 g) (Brasil, 1978).

Analiziranjem hemijskog sastava gotovih proizvoda može se zaključiti da je odabir sirovina rezultirao proizvodnjom kreker obogaćenih vlaknima i proteinima. Naime, svi kreirani krekeri sadrže preko 6% vlakana tako se mogu smatrati proizvodima koji su bogati vlaknima u skladu sa Pravilnikom o prehranbenim i zdravstvenim izjavama koje se navode na deklaraciji hrane („Sl. glasnik RS“, br. 51/2018 i 103/2018). Dodatak proteina lišća brokolija u slučaju kreker sa integralnim pšeničnim brašnom, doprineo je povećanju sadržaja proteina za oko 20% kod uzoraka sa nivoom supstitucije od 10%, odnosno za oko 30% kod uzoraka kreker sa nivoom

supstitucije od 15%, tako da se oba novokreirana krekeri mogu smatrati izvorom proteina (s obzirom da doprinose sa preko 13% i 15%, respektivno ukupnoj energetskej vrednosti) u skladu sa Pravilnikom o prehranbenim i zdravstvenim izjavama koje se navode na deklaraciji hrane („Sl. glasnik RS“, br. 51/2018 i 103/2018). Što se tiče uzoraka bezglutenskih krekeri može se primetiti da je sadržaj proteina značajno veći u poređenju sa krekerima sa integralnim pšeničnim brašnom, što je i očekivano s obzirom da je brašno leblebije bogat izvor proteina (Jeeyup Han i sar., 2010) pa samim tim proteini iz osnovne sirovine daju dodatnu vrednost celokupnom sadržaju proteina u krekerima. Takođe, svi krekeri sa brašnom leblebije, nezavisno od prisustva proteina lišća brokolija, se mogu smatrati izvorom proteina u skladu sa prethodno pomenutim Pravilnikom o prehranbenim i zdravstvenim izjavama koje se navode na deklaraciji hrane.

Sadržaj pepela značajno raste ( $p < 0,05$ ) kod obe vrste krekeri u poređenju sa kontrolnim uzorkom, kako procenat supstitucije proteina u krekerima raste. Sadržaj pepela predstavlja količinu minerala u krekerima, pa se može reći da je to povećanje posledica povećanja sadržaja minerala koji potiču iz proteina lišća brokolija. Ovaj sadržaj je značajno manji od vrednosti u prijavljenih u literaturi za različite vrste krekeri (Marian i sar., 2015; Larissa Slongo Faccioli i sar., 2021). Sadržaj masti je uslovljen izborom sirovina za proizvodnju krekeri. Bezglutenski krekeri se odlikuju većim sadržajem masti, jer inicijalno, brašno leblebije sadrži veći procenat masti.

### **5.3.2. Fizičke karakteristike**

Tokom pečenja krekeri dolazi do promena u njihovim dimenzijama, kao i do narastanja, širenja ili skupljanja samog testa. Fizičke karakteristike obe vrste krekeri, uključujući i procenat narastanja i širenja testa nakon pečenja prikazani su u Tabeli 13.

<i>Uzorak</i>	<i>Dsr (mm)</i>	<i>Visina (mm)</i>	<i>Masa (g)</i>	<i>Ekscentričnost</i>	<i>Faktor širenja</i>	<i>Narastanje (%)</i>
<i>K1</i>	42,98 ± 0,28	4,01 ± 0,19	4,13 ± 0,07	1,00 ± 0,02	10,73 ± 0,49	29,01 ± 6,00
<i>PP10</i>	42,20 ± 0,33	4,12 ± 0,23	4,08 ± 0,07	1,01 ± 0,01	10,26 ± 0,54	26.63 ± 10,89
<i>PP15</i>	42,23 ± 0,32	3,81 ± 0,14	3,93 ± 0,12	1,00 ± 0,04	11,09 ± 0,39	18,70 ± 8,88
<i>K2</i>	43,98 ± 0,16	4,26 ± 0,25	4,00 ± 0,15	1,00 ± 0,02	10,34 ± 0,61	41,67 ± 8,56
<i>LP10</i>	43,78 ± 0,17	3,86 ± 0,18	3,95 ± 0,02	0,99 ± 0,01	11,35 ± 0,52	40,46 ± 3,43
<i>LP15</i>	43,62 ± 0,06	3,81 ± 0,21	3,87 ± 0,07	1,00 ± 0,01	11,48 ± 0,67	35,00 ± 9,54

*Tabela 13. Fizičke karakteristike krekeri sa pšeničnim brašnom (PP) i brašnom leblebije (LP) obogaćenim proteinom lišća brokolija u dve različite koncentracije (PP10, PP15, LP10, LP15)*

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 13. može se zaključiti da uzorci obe vrste krekeri imaju približno iste dimenzije prečnika (Dsr) i ekscentričnosti, što ukazuje da obogaćivanje krekeri proteinima lišća brokolija nije doprinelo značajnoj promeni oblika tokom pečenja ( $p > 0,05$ ). Promene koje su zapažene tiču se visine krekeri nakon pečenja, faktora širenja i narastanja nakon pečenja. Visina kod obe vrste krekeri ( $p < 0,05$ ) značajno opada, u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Rita Ru En Tay i sar. (2022) objavili su slična zapažanja o uticaju dodatih proteina surutke u formulaciju krekeri na posmatrani pokazatelj kvaliteta. Prema tabeli X, povećanje procenta supstitucije proteina lišća brokolija dovodi do povećanja faktora širenja. Uzorci krekeri PP15 i LP15 su imali značajno veći faktor širenja, a posledično i značajno manji procenat narastanja u poređenju sa kontrolom (K1, K2). Pretpostavlja se da povećanje koncentracije supstitucije proteina lišća brokolija dovodi do toga da testo krekeri ima niži viskozitet, što utiče na to da se krekeri šire brže tokom pečenja (Ho i Abdul Latif, 2016). Veći faktor širenja dovodi do povećanja izlaganja površine krekeri visokoj temperaturi tokom pečenja, što objašnjava smanjenje procenta vlage u krekerima (Tabela X), tačnije dolazi do bržeg oslobađanja vlage iz krekeri. Ova veza se može iskoristiti i za objašnjenje značajnog smanjenja mase krekeri obogaćenih sa proteinom lišća brokolija u poređenju sa kontrolom. Slična studija objavljena od strane grupe autora Singh, Singh, Sharma, i Sakena, 2003 takođe je izvestila da se

faktor širenja povećao kako se povećavao sadržaj proteina u keksu. Takođe, veći faktor širenja proizvoda je posledica malog kapaciteta zadržavanja vode, što ukazuje na to da protein lišća ima niži kapacitet zadržavanja vode od upotrebljenih osnovnih brašna u formulacijama, što je poželjno svojstvo u konditorskoj industriji (R.R. En Tay, T. Agatha, G. Somang i sar, 2022).

### 5.3.2. Boja krekeri

Boja je jedan od najvažnijih faktora za procenu kvaliteta nekog prehrambenog proizvoda i u velikoj meri utiče na prihvatljivost od strane potrošača. Boja krekeri okarakterisana je instrumentalno pomoću parametara  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  koji su prikazani u Tabeli 14.

<i>Uzorak</i>	<i>L*(D65)</i>	<i>a*(D65)</i>	<i>b*(D65)</i>
<i>K1</i>	55,53 ± 0,93	7,62 ± 0,52	25,94 ± 0,37
<i>PP10</i>	37,50 ± 0,83	3,22 ± 0,15	17,95 ± 0,64
<i>PP15</i>	33,22 ± 1,17	2,72 ± 0,26	15,14 ± 0,62
<i>K2</i>	73,88 ± 0,91	3,42 ± 0,13	42,61 ± 0,23
<i>LP10</i>	47,13 ± 0,92	1,26 ± 0,18	23,74 ± 0,49
<i>LP15</i>	42,14 ± 0,72	1,40 ± 0,11	20,15 ± 0,25

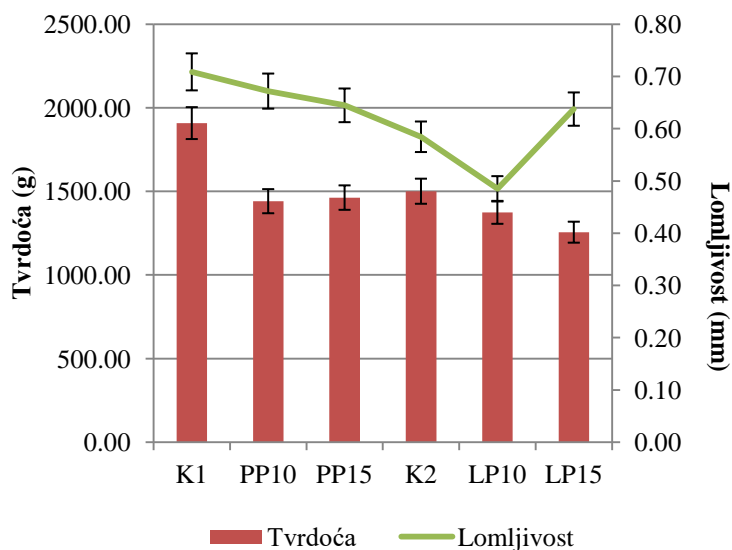
Tabela 14. CIE Lab hromatski parametri dve vrste krekeri (sa integralnim pšeničnim brašnom PP i sa leblebijinim brašnom LP) obogaćenih proteinom lista brokolija

Krekeri koji sadrže protein lišća brokolija, posedovali su neuobičajenu boju za ovu vrstu proizvoda, što je jasno uočljivo sa slike 1. Krekeri LP10 i LP15 imaju izraženu tamno - zeleno do braon boju, a intenzitet boje se povećava sa povećanjem supstitucije osnovnog brašna proteinom lišća brokolija od kojeg potiče. Krekeri PP10 i PP15 odlikuju se izraženom tamno braon bojom koja delom potiče od boje brašna ali i od proteina lišća brokolija. Takođe, braon boja krekeri može biti i posledica Maillard-ove reakcije koja nastaje između slobodnih amino-grupa (Jeewanthi i sar., 2015) i prisutnih šećera tokom pečenja, formirajući braon polimere ili melanoidin (Laguna, Varela, Salvador, Sanz, & Fiszman, 2012). U prilog tome govori vrednost

L\*, koja značajno opada ( $p < 0,05$ ) sa povećanjem udela proteina lišća brokolija. Parametar a\* značajno je veći kod K1 kontrole izrađene samo od integralnog pšeničnog brašna nego kod K2 kontrole izrađene od brašna leblebije, ali svakako u oba slučaja značajno opada sa povećanjem supstitucije a razlog tome je povećanje udela zelene boje koja potiče od proteina lišća brokolija u obogaćenim krekerima. Takođe, parametar b\*, kod obe vrste krekeri opada, sa smanjenjem žute boje prisutne u njima, a značajno je veći kod uzoraka krekeri sa brašnom leblebijinim brašnom.

### 5.3.3. Teksturna svojstva krekeri

Tvrdoća je definisana kao maksimalna sila potrebna za kompresiju hrane u funkciji vremena i predstavlja jedan od značajnih pokazatelja kvaliteta gotovog proizvoda. Prilikom kreiranja proizvoda uvođenjem nutritivno vrednih sastojaka u proizvode na bazi pšeničnog brašna gde se sadržaj glutena kao glavnog nosioca strukture smanjuje a naročito u slučaju bezglutenskih proizvoda, postizanje prihvatljivih teksturnih svojstava gotovog proizvoda je od izuzetne važnosti. Teksturna svojstva, odnosno tvrdoća i lomljivost krekeri kao rezultat varijacije količine proteina lišća brokolija prikazani su na Slici 31. Generalno, dodatak proteina lišća brokolija uticao je na smanjenje tvrdoće krekeri, pri čemu je ono izražajnije kod uzoraka krekeri sa integralnim pšeničnim brašnom.



Slika 31. Parametri tvrdoće i lomljivosti dve vrste krekeri (PP i LP) obogaćenih proteinom lišća brokolija

Krekeri PP10 (1440,99) i PP15 (1462,42) imali su značajno nižu ( $p < 0,05$ ) tvrdoću u poređenju sa K1 (1908,04), dok se tvrdoća kod PP10 i PP15 ne razlikuje statistički značajno ( $p > 0,05$ ). Kod krekeri LP15 (1255,54) tvrdoća se značajno smanjuje ( $p < 0,05$ ) u poređenju sa kontrolnim uzorkom (1500,57). Rezultati teksturnih svojstava ispitivanih uzoraka krekeri su u skladu sa rezultatima fizičkih karakteristika krekeri (visina i faktor širenja) pri čemu su uzorci sa manjom visinom i većim faktorom širenja ispoljili manju tvrdoću pod dejstvom sile. Još jedan razlog za smanjenje tvrdoće krekeri nakon dodavanja proteina lišća brokolija sa integralnim pšeničnim brašnom može biti usled nedovoljno razvijenog glutena u sistemu. Dodatak proteina verovatno usporava formaciju glutenske mreže ograničavanjem dostupne vode za stvaranje glutena, a time smanjuje jačinu testa (Rita Ru En Tay, Talia Agatha, Gweon Somang, Oni Yuliarti, 2022). Međutim, tvrdoća bezglutenskih obogaćenih krekeri (LP10, LP15) ne razlikuje se značajno ( $p > 0,05$ ) od kontrolnog uzorka, što ukazuje na to da dodatak proteina nije imao značajan uticaj na ovo svojstvo matriksa.

Lomljivost kao teksturni pokazatelj ukazuje na lakoću s kojom će se materijal slomiti pod dejstvom sile (Sing, Sing, Dža, Rasane i Gautam, 2015). Lomljivost krekeri PP10 (0,67 mm) i PP15 (0,64 mm) bila je značajno manja u poređenju sa kontrolnim krekerom K1 (0,71 mm). U slučaju bezglutenskih krekeri, prisustvo proteina lišća brokolija nije značajno uticao na vrednosti lomljivosti te se može pretpostaviti da sinergističke interakcije proteina leblebije i lišća brokolija nisu imala značajan uticaj na pogoršavanje ovog teksturnog pokazatelja.

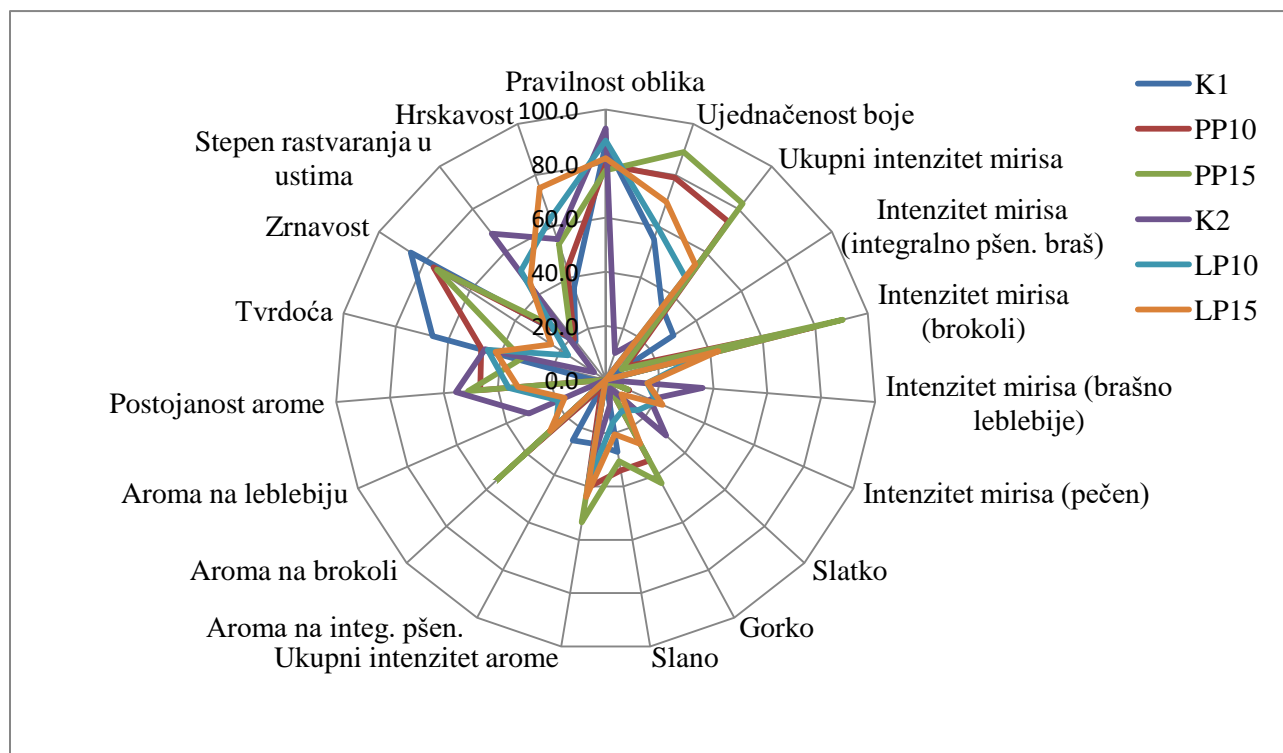
### **Senzorska analiza krekeri**

Senzorska ocena obe vrste krekeri obogaćenih proteinom lista brokolija urađena je sa ciljem ispitivanja definisanih svojstava novih formulacija od strane ispitivača. Kod primene različitih vrsta supstituenata u standardnim formulacijama i glutenskih i bezglutenskih krekeri veoma je bitna senzorska ocena različitih parametara radi dobijanja korisnih podataka o konzumnoj prihvatljivosti proizvoda, radi što lakšeg približavanja nove formulacije zahtevima tržišta.

Ocenjivanje je sprovedeno od strane ekspertskog panela sastavljenog od deset ocenjivača (6 žena i 4 muškarca, starosti od 25 do 40 godina) sa iskustvom u oceni senzorskog kvaliteta različitih vrsta finih pekarskih proizvoda. Uzorci krekeri su ocenjeni na nestrukturiranoj linearnoj skali od 0 do 100 mm, gde 0 ukazuje na nepostojanje svojstva a 100 na znatno izraženo svojstvo.



Rezultati deskriptivne senzorske analize obe vrste obogaćenih krekeri prikazani su dijagramom “pauk” (Slika 32).



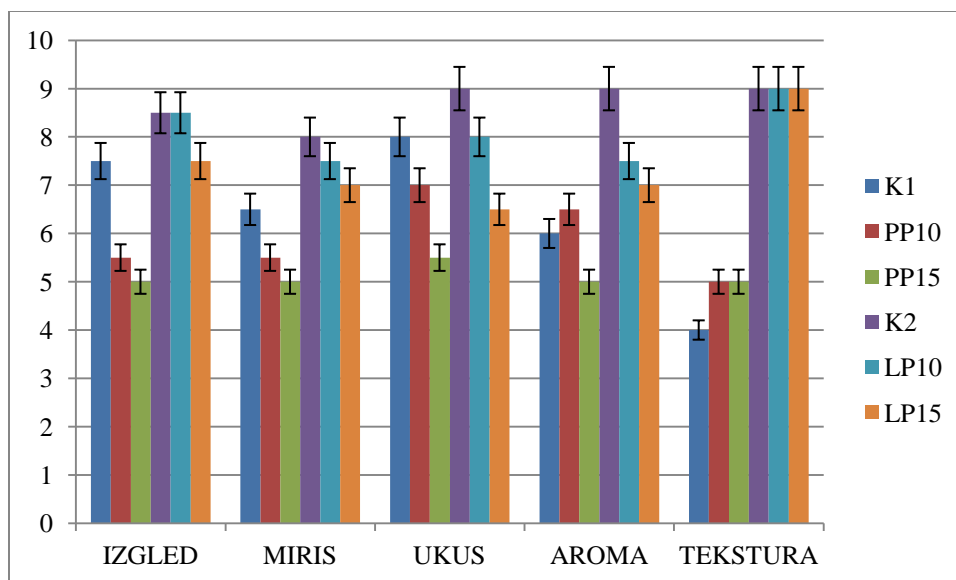
Slika 32. Senzorska ocena obe vrste krekeri primenom testa dopadljivosti

Poredeći opažene intenzitete za pojedina svojstva, uočava se značajna razlika senzorskih karakteristika obe vrste obogaćenih krekeri sa proteinom lišća brokolija (PP10, PP15, LP10, LP15) u poređenju sa odgovarajućim kontrolnim uzorcima (K1, K2). Kod krekeri sa integralnim pšeničnim brašnom obogaćenih proteinom lišća najveće razlike u poređenju sa kontrolom ogledaju se u, ujednačenosti boje, zrnavosti, intenzitetu mirisa, intenzitetu mirisa na brokoli, intenzitetu gorkog ukusa, hrskavosti. Pravilnost oblika za PP10 i PP15 je veoma slična ali je na manjem nivou u odnosu na kontrolu K1. Ujednačenost boje najviše je izražena kod PP15, zatim kod PP10, a najmanja ujednačenost je kod kontrolnog uzorka K1, što je posledica povećanja koncentracije proteina lišća u formulaciji krekeri (PP10, PP15) od kojeg potiče njihova tamno zelena – braon boja. Pored očekivanog mirisa na brokoli, sa porastom koncentracije proteina lišća u formulaciji, raste i ukupan intenzitet mirisa krekeri, a samim tim intenzitet mirisa na integralno pšenično brašno opada. Što se tiče ukusa, ono po čemu se obogaćeni krekeri (PP10 i PP15) izdvajaju od kontrolnog uzorka K1, je pojava gorkog ukusa, pri čemu sa porastom nivoa

supstitucije ovo svojstvo postaje jače izraženo. Gorak ukus potiče od kompleksa polifenol – protein koji se stvara u procesu taloženja proteina lišća, što se negativno odražava na aromu i ukupnu dopadljivost prehrambenih proizvoda sa dodatkom proteina lišća što ujedno i ograničava njegovu primenu u prehrambene svrhe (D’alvise, Lesueur-Lambert, Fertin, Dhulster, & Guillochon, 2000; Yu i sar., 2016). Hrskavost je svojstvo koje povećava dopadljivost proizvoda, a naročito ide u prilog proizvodu kao što je kreker. U slučaju ove vrste, hrskavost je ocenjena značajno izraženijom kod obogaćenih krekeri (PP10, PP15) nego kod kontrolnog uzorka krekeri K1.

U slučaju bezglutenskih krekeri obogaćenih proteinom lišća brokolija (LP10, LP15) najveće razlike u poređenju sa kontrolom ogledaju se u pogledu ujednačenosti oblika, boje, intenziteta mirisa i ukusa kao i zrnivosti i stepena rastvaranja u ustima. Poredeći opažene intenzitete za pojedina svojstva, uočava se da krekeri sa dodatkom proteina poseduju manju pravilnost oblika, veću ujednačenost boje, veći ukupan intenzitet mirisa i arome, veću zrnivost i manju postojanost arome u odnosu na kontrolni uzorak. Dodatak proteina je doprineo opažanju svojstava karakterističnih za ovaj dodatak a to su miris i aroma na brokoli kao i gorak ukus. Sa druge strane, kod bezglutenskih krekeri je opažen manji intenzitet pomenutih svojstava u odnosu na obogaćene krekeri integralnog pšeničnog brašnasa PP10 i PP15. Trend promene senzorski utvrđenog svojstva tvrdoće je u skladu sa instrumentalno određenim rezultatima za teksturu krekeri.

Dodatno, ocenjena je ukupna dopadljivost krekeri (Slika 33) u pogledu izgleda, mirisa, ukusa, arome i teksture korišćenjem hedonske skale sa rasponom ocena od 1 do 9, gde je 1 – izuzetno mi se ne sviđa, 5 – niti mi se sviđa niti mi se ne sviđa, 9 – izuzetno mi se sviđa.



Slika 33. Ukupna dopadljivost obe vrste krekeri (PP i LP) obogaćenih proteinom lišća brokolija

Sa dijagrama (Slika 33) jasno može da se uoči da je ukupna dopadljivost značajno veća kod uzoraka krekeri pripremljenih sa brašnom leblebije (K2, LP10, LP15). Što se tiče parametara dopadljivosti u pogledu izgleda, mirisa, ukusa, arome, strukture, i ukusa uzorci krekeri sa leblebijinim brašnom ocenjeni su sa najvećim ocenama za razliku od krekeri sa integralnim pšeničnim brašnom. Uzorak krekeri PP15 ima najmanje ocene parametara dopadljivosti.

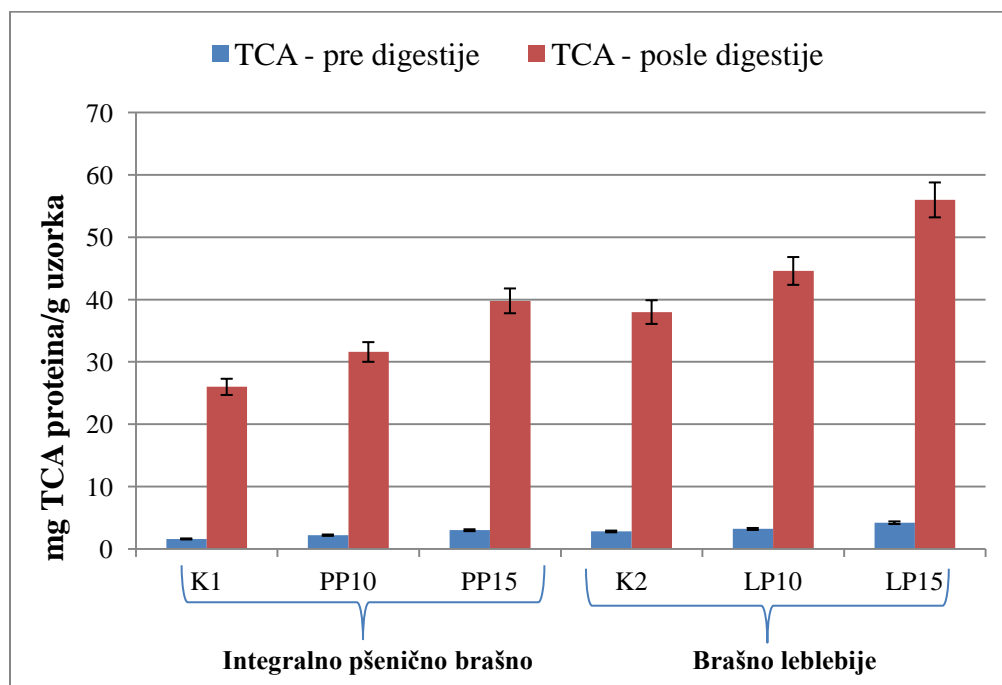
Na osnovu senzorske analize novokreiranih krekeri može se zaključiti da prilikom izrade formulacije za proizvodnju krekeri sa dodatkom proteina lišća brokolija veliku ulogu ima odabir osnovne sirovine. Brašno leblebije se izdvojilo kao pogodniji izbor pri kreiranju formulacije što potvrđuje i ocena ukupne dopadljivosti krekeri. Prisustvo brašna leblebije rezultiralo većom dopadljivošću u pogledu gotovo svih analiziranih senzorskih svojstava a kao najznačajniji pozitivan uticaj izdvojio se smanjenje intenziteta gorkog ukusa.

#### 5.3.4. *In vitro* digestija

Simulacijom gastrointestinalnog trakta (GIT) čoveka, primenom model sistema - *in vitro* digestije ispitana je svarljivost obe vrste krekeri obogaćenih proteinom lišća brokolija. Prilikom prolaska krekeri kroz GIT praćeno je njihovo ponašanje u različitim uslovima sredine (pH i jonska jačina), kao i uticaj na oslobađanje bioaktivnih peptida. *In vitro* digestija, simulirana je tako da obuhvata sve faze varenja od usta do tankog creva, u prisustvu enzima ( $\alpha$ -amilaze,

pepsina i pankreatina), i želudačnih i crevnih sokova. U prethodnim istraživanjima disertacije, prikazana je dobra svarljivost proteina lišća brokolija (Slika 21), kao i dobra antioksidativna aktivnost digestiva (Sedlar i sar, 2020), što se očekuje i prilikom njegove inkorporacije u prehrambeni matriks što spada u cilj ovog dela istraživanja.

Rezultati *in vitro* digestije prikazani su na Slici 34, i predstavljeni su praćenjem sadržaja peptidnih frakcija, TCA - proteina krekeri koji nastaju pre digestije i TCA - proteina krekeri nakon digestije.



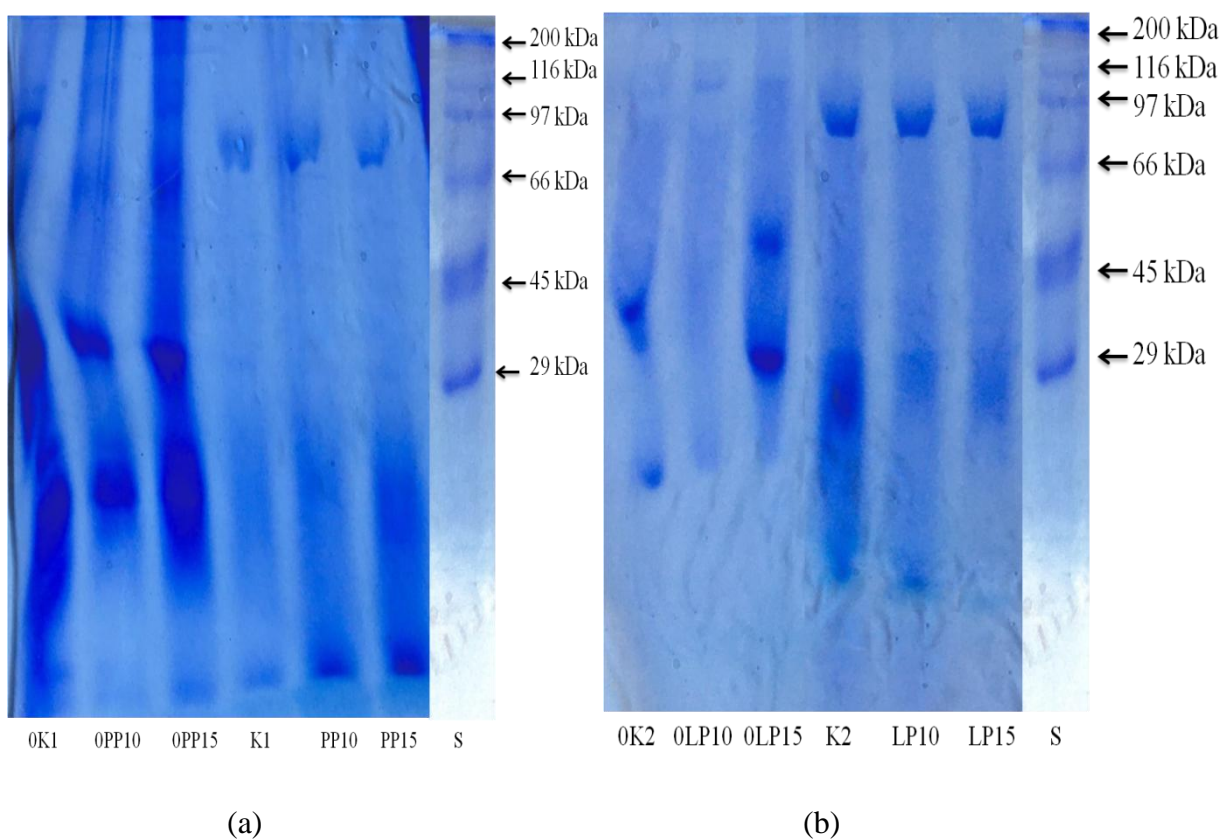
Slika 34. TCA – proteini pre i nakon *in vitro* digestije krekeri obogaćenih proteinima lišća brokolija

Vrednosti sadržaja TCA – proteina krekeri pre i posle digestije ukazuju na stepen njihove svarljivosti. Prema prikazanim rezultatima može se zaključiti da je sadržaj TCA – proteina krekeri značajno ( $p < 0,05$ ) veći u odnosu na njihov sadržaj pre digestije. Generalno, sa povećanjem sadržaja supstitucije proteina lišća brokolija u krekerima, dolazi do linearnog porasta sadržaja TCA – proteina posle digestije, pri čemu je njihov sadržaj značajno veći kod krekeri sa brašnom leblebije (K2, PP10, PP15) u odnosu na krekeri sa integralnim pšeničnim brašnom (K1, PP10, PP15). Najveći sadržaj TCA – proteina je kod LP15 (56 mg/g), a zatim LP10 (44,6 mg/g) vrednosti značajno veće u odnosu na sadržaj TCA – proteina kontrole K2 (38

mg/g), zatim sledi PP15 (39,8 mg/g), PP10 (31,6 mg/g) takođe vrednosti značajno veće u odnosu na TCA – K1 (26 mg/g).

Ovakvi rezultati *in vitro* digestije, jasno ukazuju da su obe vrste krekeri prilikom direktne konzumacije svarljivi. Takođe, zbog prisustva peptida manjih molekularskih masa, postoji potencijalna bioaktivnost nakon njihovog prolaska kroz digestivni trakt. Generalno, veća svarljivost obogaćenih krekeri od leblebijinog brašna govori o tome da takav matriks više pogoduje uslovima i promenama sredine GIT-a.

*In vitro* digestija krekeri praćena je elektroforezom i distribucija molekularskih masa (29 kDa - 200 kDa) dobijenih hidrolizata prikazana na Slici 35.



Slika 35. Elektroforetski profili hidrolizata krekeri pre (OK1, OPP10, OPP15, OK2, OLP10, OLP15) i posle *in vitro* digestije (K1, PP10, PP15, K2, LP10, LP15), S – standardi molekularskih masa

Na Slici 35a prikazan je elektroforetski profil hidrolizata pre i posle *in vitro* digestije krekeri od integralnog pšeničnog brašna. Intenzivne boje trake krekeri pre digestije primećuju se najviše na 97 kDa, 66 kDa, 30 kDa i 14 kDa, i dosta su intenzivnije kako procenat proteina lišća brokolija raste. Ovo je u skladu sa rezultatima koji su opisani u prethodnom poglavlju disertacije Slika 26, gde su intenzivne trake molekulskih masa 30kDa i 14 kDa prikazane za protein lišća brokolija. Kod uzoraka krekeri posle *in vitro* digestije Slika 35a primećuje se nestanak traka velikih molekulskih masa, a pojavljuju se trake malih molekulskih masa pozicionirane ispod 20 kDa i 14 kDa, a intenzitet im se povećava sa povećanjem procenta proteina lišća brokolija. Takođe, primećene su i trake molekulskih masa između 66 kDa i 97 kDa. Ovakav rezultat posle *in vitro* digestije jasno ukazuje na prisustvo peptida malih molekulskih masa obogaćenih krekeri od integralnog pšeničnog brašna. Takođe, kod *in vitro* digestije krekeri sa brašnom leblebije Slika 35b, pre digestije mogu da se uoče trake velikih molekulskih masa 97 kDa, 50 kDa, 29 kDa, a nakon digestije dolazi do njihovog nestanka. Trake koje se pojavljuju i koje su ispod 29 kDa jasno ukazuju na prisustvo peptida manjih molekulskih masa. Takođe, i kod ovih uzoraka primećuje se nastanak traka molekulskih masa pozicionirane između 66 kDa i 97 kDa

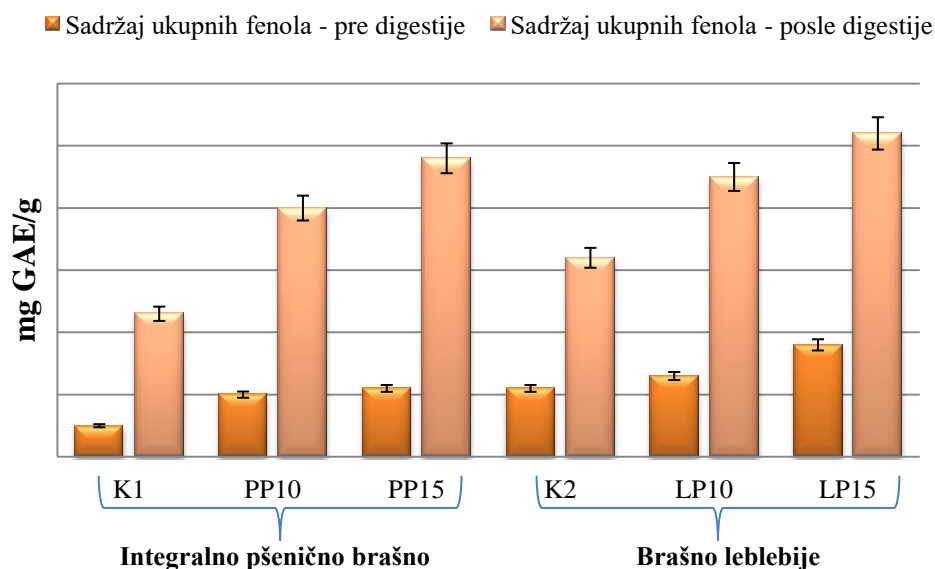
Na osnovu ovih rezultata može se reći da su krekeri nakon konzumacije svarljivi, i predstavljaju izvore sa potencijalnom bioaktivnom ulogom, zbog prisustva peptida malih molekulskih masa. Takođe elektroforezom je potvrđena efikasnost *in vitro* digestije obe vrste krekeri.

### **5.3.2. Sadržaj ukupnih fenola nakon *in vitro* digestije**

Fenolna jedinjenja su široko zastupljena u među različitim biljnim vrstama, a njihova pojava u lako dostupnim jeftinim izvorima poput agroindustrijskog otpada dovela je u poslednjoj deceniji do povećanja interesovanja za njihovo izolovanje i eksploataciju. Većina ovih jedinjenja je poseduje korisna bioaktivna svojstva povoljna za ljudsko zdravlje (npr. u prevenciji raka i kardiovaskularnih bolesti) kao što su antioksidativna aktivnosti i inhibicija reaktivnih vrsta kiseonika nastalih u okruženju oksidativnog stresa odgovorni za nastanak nekoliko inflamatornih i degenerativnih bolesti (Lucia Panzella i sar., 2020).

U prethodnom delu doktorata, pokazano je da lišće brokolija predstavlja izvor polifenolnih jedinjenja (Slika 29). Prema literaturnim podacima (Guo i sar. 2001) pri poređenju antioksidativnog kapaciteta različitih delova biljaka brokolija (cvet, stabljike i listovi) potvrđeno

da lišće i jestivi delovi imaju slična antioksidativna svojstva kao i jestivi delovi. Takvi rezultati sugerišu da se nusproizvodi brokolija mogu efikasno koristiti kao dodaci ishrani. Određivanjem sadržaja ukupnih fenola pre i nakon *in vitro* digestije obogaćenih krekeri (Slika 36) praćena je stabilnost bioaktivnih komponenata koji poseduju potencijalne benefite po zdravlje.

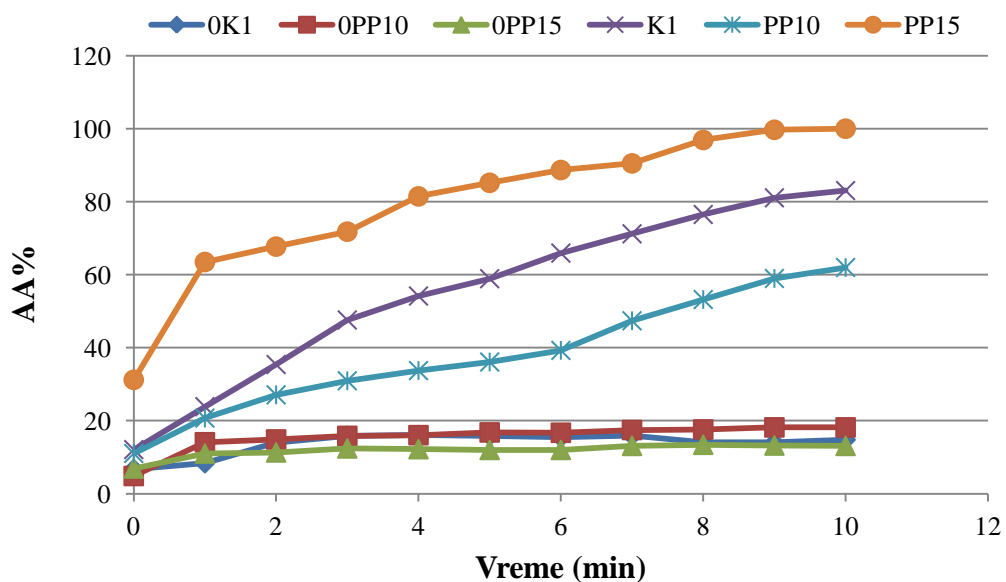


Slika 36. Sadržaj ukupnih fenola krekeri pre i posle *in vitro* digestije

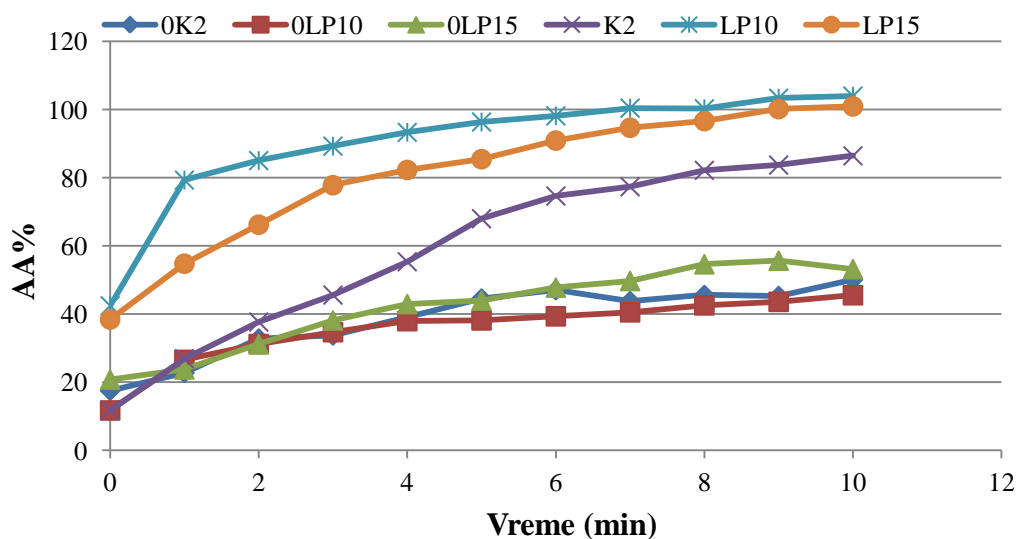
Sadržaj ukupnih fenola posle digestije se kretao u rangu od 4,6 mg GAE/g za K1 do 9,6 mg GAE/g za PP15, i u rangu od 6,4 mg GAE/g za K2 do 10,4 mg GAE/g za LP15. Sa Slike 36 jasno može da se uoči da je sadržaj ukupnih fenola posle digestije svih krekeri značajno veći ( $p < 0,05$ ) u odnosu na sadržaj pre digestije, i linearno raste sa porastom supstitucije proteina lišća brokolija. Rezultati ukazuju na to da je nakon *in vitro* digestije došlo do poboljšanog oslobađanja ukupnih fenola.

### 5.3.2. Antioksidativna aktivnost nakon *in vitro* digestije

Antioksidativna aktivnost (AA) hidrolizata krekeri pre i posle digestije prikazana je na Slici 37. Ispitana je metodom neutralizacije ABTS katjon radikala i beležena je svakog minuta u vremenskom toku od 10 minuta, a svi krekeri nakon digestije poseduju AA.



(a)



(b)

Slika 37. Antioksidativna aktivnost hidrolizata krepera (a) sa integralnim pšeničnim brašnom pre 0K1, 0PP10, 0PP15 i posle K1, PP10, PP15 digestije (b) i brašnom leblebije pre 0K2, 0LP10, 0LP15 i posle K1, LP10, LP15 digestije

Kod svih uzoraka uočava se sličan trend krive, gde AA raste tokom vremena i dostiže maksimalnu vrednost nakon 10 minuta. Hidrolizati obogaćenih krepera nakon digestije imaju značajno veću ( $p < 0,05$ ) AA u odnosu na kontrolni uzorak. AA je najveća za PP15 (100%) izuzetak je AA za PP10 koja je značajno niža (62%) u poređenju sa kontrolom K1 (83%) (Slika 37a). LP10 (103%) i LP15 (100%) ( $p > 0,05$ ) imaju značajno veću AA u poređenju sa kontrolom



K2 (86%) (Slika 37b). Inkorporiranje proteina lišća brokolija u ovu vrstu matriksa rezultovalo je povećanjem AA. AA aktivnost hidrolizata nakon digestije može biti posledica oslobađanja sadržaja fenolnih komponenata koji vode poreklo od proteina lišća brokolija ali u velikoj meri i od oslobođenih peptida iz ovog proteina što je u skladu sa prethodnim rezultatima dobijenih za sadržaj ukupnih fenola i TCA – proteina.

Prema tome, ovi rezultati ukazuju na to da ovi krekeri nakon *in vitro* digestije, tačnije njihovom direktnom konzumacijom, mogu pokazati svojstvo hvatača slobodnih radikala, a da protein izolovan iz nusproizvoda agroindustrije lišća brokolija, može da poboljša antioksidativna svojstva ove vrste prehrambenog proizvoda.

## 6. Zaključak

U okviru ove doktorske disertacije istraživanja su bazirana na ekstrakciji proteina iz nusproizvoda prerade povrća – zelenog lišća, sa ciljem ispitivanja njihovih funkcionalnih i bioloških karakteristika, kao i razvoja novih formulacija prehrambenih proizvoda na bazi ovih proteina. Akcenat je stavljen na valorizaciju nusproizvoda agroindustrije koji nastaju nakon uzgoja i branja povrća u cilju dobijanja novih proteina.

Istraživanja su sprovedena na proteinima dobijenih iz lišća karfiola, brokolija, kupusa i cvekle.

U prvoj fazi istraživanja, proteini lišća dobijeni primenom alkalne ekstrakcije iskarakterisani su u pogledu funkcionalnih i bioloških osobina, ispitana je njihova svarljivost kao i antioksidativni potencijal dobijenih hidrolizata.

U drugoj fazi, istraživanja su bazirana na unapređenju procesa ekstrakcije proteina lišća primenom ultrazvučnog i enzimskog predtretmana, a efikasnost ekstrakcije praćena je ispitivanjem funkcionalnih i fizičkih karakteristika dobijenih proteina lišća.

U trećoj fazi, istraživanja su sprovedena sa fokusom na primenu proteina lišća brokolija kao funkcionalnog dodatka u prehrambeni matriks – kreker, sa ciljem kreiranja poboljšanog proizvoda, ispitivanja njegovih fizičko – hemijskih, strukturnih i senzornih osobina, *in vitro* digestije i antioksidativnog potencijala.

Na osnovu rezultata u prvoj fazi istraživanja, izvedeni su sledeći zaključci:

- Sadržaj proteina u lišću iznosio je za karfiol: 4,76%, brokoli: 6,13%, kupus: 3,39%, cveklu: 5,36%. Na osnovu Ozbornove klasifikacije proteinskih frakcija kao dominantni izdvajaju se albumini čije je sadržaj iznad 40%, za sve izvore lišća osim brokolija, gde je iznosio 31,66%. Najmanji sadržaj u lišću karfiola, kupusa i cvekle zauzimaju prolamini, a kod brokolija globulini.
- Proteinski sadržaj u proteinima lišća dobijenim primenom alkalne ekstrakcije bio je najveći za karfiol (72%), zatim slede kupus (65%), brokoli (57%) pa cvekla (54%) Proteinski ekstrakcioni prinos kod kupusa iznosio je 14%, i značajno je veći ( $p < 0,05$ ) u odnosu na vrednosti za ostale proteine lišća, 6,8% kod karfiola, 6,2% kod cvekle i 4,4% kod brokolija.

- Karakterizacijom proteina lišća primenom SDS-elektroforeze dokazano je prisustvo tri grupe intenzivnih traka koje odgovaraju molekulskim masama od oko 45, 25 i 14 kDa. Polipeptidne trake od 14 kDa pripadaju najzastupljenijoj frakciji proteina - albuminima, a polipeptidne trake od 25 kDa pripadaju globulinskoj frakciji proteina. Takođe, može se reći da polipeptidne trake u području molekulskih masa od 24-29 kDa pripadaju proteinskim frakcijama glutelina i prolamina. Takođe, primenom FTIR - spektrometrije dokazno je da proteini imaju međusobno veoma sličan profil spektra, i da pokazuju apsorpciju na talasnim dužinama koje odgovaraju karakterističnoj strukturi proteina.
- Ispitana su funkcionalna svojstva dobijenih proteina lišća. Rastvorljivost je ispitana u funkciji pH. Svi proteini lišća pokazuju značajno veću rastvorljivost u alkalnoj nego u kiselj sredini, sa minimalnom rastvorljivošću između pH 4 i 6, što ukazuje na pH vrednosti izoelektričnih tački proteina. Stabilnost emulzija ispitana je praćenjem kringing indeksa (KI) tokom 14 dana sklasištenja. Najstabilnije emulzije su one pripremljene od proteina lišća kupusa (KI 22%) i karfiola (KI 19%), dok raslojavanje emulzija pripremljenih od proteina lišća cvekle i brokolija započinje skoro odmah nakon pripreme. Sposobnost formiranja pene određena je sa dva parametra: kapacitet (FC) i stabilnost pene (FS). Generalno, proteini lišća pokazuju visoke vrednosti za FC, koje su u korelaciji sa sadržajem proteina u proteinima lišća, jer najveće vrednosti FC imaju proteini lišća kupusa i karfiola (90% i 92%), dok nešto manje vrednosti imaju proteini lišća brokolija i cvekle (86% i 88%). Može se zaključiti da se svi ispitivani proteini lišća mogu smatrati pogodnim sastojcima sa svojstvima pogodnim za formiranje pene u upotrebi u različitim prehrambenim proizvodima. Prema vrednostima dobijenim za kapacitet vezivanja ulja može se zaključiti da ovi proteina lišća nisu pokazali poželjnu sposobnost da apsorbuju i zadržavaju ulje i nisu poželjni u upotrebi u prehrambenim proizvodima ovog tipa. A na osnovu vrednosti za kapacitet vezivanja vode proteina lišća kupusa i karfiola može se reći da mogu primeniti u hrani kao što su supe i prelive. Protein lišća brokolija i cvekle nisu pokazali poželjnu sposobnost za kapacitet vezivanja vode.
- Svarljivost proteina lišća ispitana je metodom *in vitro* digestije, primenom enzima pepsina i pankreatina simulirajući gastrointestinalni trakt čoveka. Nakon digestije pepsinom vrednost stepena hidrolize za protein lišća karfiola, brokolija, kupusa i cvekle dostiže vrednosti od 41,45%, 38,36%, 33,75% i 26%, respektivno, a digestija

pankreatinom dovodi do povećanja DH gde su konačne vrednosti za protein lišća karfiola 50,85%, brokolija 57,86%, kupusa 63,69% i cvekle 40,76%. Što ukazuje da su ovi proteini lako svarljivi.

- Antioksidativna aktivnost hidrolizata nakon *in vitro* digestije ispitana je testovima neutralizacije ABTS radikal katjona i DPPH radikala. Hidrolizati poseduju značajno visoku antioksidativnu aktivnost već nakon digestije pepsinom. Nakon digestije pankreatinom, hidrolizati zadržavaju antioksidativnu aktivnost, međutim kao bolji test u ovom slučaju pokazao se ABTS.

Na osnovu rezultata u drugoj fazi istraživanja izvedeni su sledeći zaključci:

- Primenom ultrazvučnog predtretmana pri ekstrakciji lišća karfiola, brokolija, kupusa i cvekle, proteinski ekstrakcioni prinos uvećan je za lišće karfiola i brokolija, a smanjen za lišće kupusa, i bez značajnih promena za lišće cvekle u poređenju sa proteinima lišća bez primene pretretmana. Sadržaj proteina je značajno manji kod proteina lišća primenom ultrazvučnog pretretmana karfiola, cvekle i kupusa, osim za brokoli gde je došlo do povećanja sadržaja proteina, što znači da ovaj predtretman nije odgovarajući za sve vrste sirovina.
- Rastvorljivost proteina lišća dobijenih ultrazvučnim predtretmanom pokazuje minimalnu rastvorljivost u opsegu pH od 2 do 6, sa povećanjem rastvorljivosti u alkalnoj sredini. Međutim, rastvorljivost je značajno niža u alkalnoj sredini u poređenju sa proteinima lišća dobijenih bez primene predtretmana, što ukazuje na to da ultrazvuk nije doprineo poboljšanju funkcionalnih osobina.
- Enzimski predtretman primenjen je pri ekstrakciji proteina lišća karfiola i brokolija delovanjem različitih koncentracija enzimskog kompleksa celulitičkih i pektolitičkih enzima (Viscozyme<sup>®</sup> L i Vinoxyme) pri enzim/supstrat odnosu od 0,2%, 2,5% i 4,8%. Pri E/S odnosu 4,8%, došlo je do povećanja ekstrakcionog proteinskog prinosa za 10% u odnosu na kontrolu. Sadržaj proteina kod karfiola, pri E/S odnosu 4,8%, iznosio je 77,27%, a kod brokolija 84,66%.
- Karakterizacija proteina lišća dobijenih primenom enzimskog predtretmana ispitana je SDS–elektroforezom pri čemu je dokazano da veća koncentracija enzimskog kompleksa dovodi do pojave traka jačeg intenziteta što je u skladu sa sadržajem proteina u uzorcima.

Ovo ukazuje na to da koncentracija enzimskog kompleksa od 4.8% E/S Viscozyme<sup>®</sup> L i Vinozyme<sup>®</sup> može dovesti do efikasnije dezintegracije ćelijskog zida i na taj način pomoći oslobađanju veće količine proteina. FTIR spektrometrijom takođe je potvrđena karakteristična struktura proteina kod ispitivanih uzoraka proteina lišća i dokazana je efikasnost enzimske ekstrakcije proteina; sa porastom koncentracije enzimskog kompleksa, karakteristični pikovi amida A, amida B, amida I, II, III pokazivali su veće apsorpcione brojeve. Takođe, spektar proteina lišća dobijenih primenom enzimskog predtretmana poseduju skoro isti apsorpcioni spektar kao i proteini lišća dobijenih bez predtretmana.

- Profili rastvorljivosti proteina lišća ukazuje na to da je veća rastvorljivost u alkalnoj, nego u kiselj sredini, i raste sa porastom koncentracije primenjenog enzimskog kompleksa. Veća rastvorljivost proteina lišća brokolija u odnosu na karfiol je u pozitivnoj korelaciji sa proteinskim prinosom.
- Enzimski tretman odrazio se i na povećanje sadržaja ukupnih aminokiselina, kao i sadržaja esencijalnih aminokiselina proteina lišća karfiola i brokolija. Odnos esencijalnih prema neesencijalnim amino kiselinama prelazi vrednost od 0,6 (0,65 - 0,78) što je iznad standardnih vrednosti koje preporučuje FAO/WHO. Sve vrste ispitanih proteina lišća prema WHO/FAO/UNU *Expert Consultation 2007* mogu da posluže kao visokokvalitetan izvor proteina i mogu značajno doprineti uravnoteženoj ishrani ljudi.
- Sadržaj ukupnih fenola ispitivan je u cilju za određivanje stepena prečišćenosti proteina. U procesu ekstrakcije proteina kroz faze prečišćavanja dolazi do drastičnog smanjenja sadržaja ukupnih fenola prisutnih u rastvoru.

Na osnovu rezultata u trećoj fazi istraživanja izvedeni su sledeći zaključci:

- U kreiranju dva nova funkcionalna proizvoda: krekeri od integralnog pšeničnog brašna (glutenski), i krekeri od brašna leblebije (bezglutenski), izvršena je supstitucija osnovnog brašna proteinom lišća brokolija u dva nivoa 10% i 15%. Dodatak proteina lišća brokolija u glutenske kekere doprineo je povećanju sadržaja proteina za oko 20%, kod uzoraka sa nivoom supstitucije od 10%, odnosno za oko 30% kod uzoraka krekeri sa nivoom supstitucije od 15%. Obe formulacije novokreiranih krekeri mogu se smatrati “izvorom proteina” (s obzirom da doprinose sa preko 13% i 15%, respektivno, ukupnoj energetske vrednosti). Takođe, svi krekeri sa brašnom leblebije, nezavisno od prisustva proteina lišća

brokolija, se mogu smatrati izvorom proteina u skladu sa Pravilnikom o prehranbenim i zdravstvenim izjavama koje se navode na deklaraciji hrane.

- Povećanje supstitucije proteina lišća brokolija dovelo je do povećanja faktora širenja, a posledično i do smanjenja procenta narastanja krekeru u poređenju sa kontrolom. Protein lišća brokolija značajno je uticao na boju krekeru sa povećanjem supstitucije osnovnog brašna. Parametri  $L^*$ ,  $a^*$ , i  $b^*$  značajno opadaju sa povećanjem supstitucije proteina lišća brokolija.
- Teksturna svojstva krekeru ukazuju na to da je povećanje supstitucije proteina lišća brokolija, uticao na tvrdoću i lomljivost krekeru. Tvrdoća je značajno manja kod uzoraka krekeru od integralnog pšeničnog brašna obogaćenih proteinom lišća brokolija, dok kod krekeru sa brašnom od leblebije dodatak proteina nije imao uticaj na tvrdoću krekeru. Takođe, lomljivost krekeru sa integralnim pšeničim brašnom sa dodatkom proteina lišća brokolija bila je značajno manja u poređenju sa kontrolnim krekerom. U slučaju bezglutenskih krekeru, prisustvo proteina lišća brokolija nije značajno uticao na vrednosti lomljivosti te se može pretpostaviti da sinergističke interakcije proteina leblebije i lišća brokolija nisu imala značajan uticaj na pogoršavanje ovog teksturnog pokazatelja.
- Prema rezultatima senzorske ocene obogaćenih krekeru, uočava se da krekeri sa dodatkom proteina poseduju manju pravilnost oblika, veću ujednačenost boje, veći ukupan intenzitet mirisa i arome, veću zrnavost i tvrdoću i manju postojanost arome u odnosu na kontrolni uzorak. Dodatak proteina lišća brokolija je doprineo opažanju svojstava karakterističnih za ovaj dodatak a to su miris i aroma na brokoli kao i gorak ukus.
- Na ukupne dopadljivosti novokreiranih krekeru, brašno leblebije se izdvojilo kao pogodniji izbor pri kreiranju formulacije što potvrđuje i ocena njihove ukupne dopadljivosti. Ovo je rezultiralo većom dopadljivošću u pogledu gotovo svih analiziranih senzorskih svojstava kod krekeru, a kao najznačajniji pozitivan uticaj izdvojio se smanjenje intenziteta gorkog ukusa.
- Simulacijom gastrointestinalnog trakta (GIT) čoveka, primenom model sistema - *in vitro* digestije ispitana je svarljivost obe vrste krekeru obogaćenih proteinom lišća brokolija. Praćenjem sadržaja TCA – proteina pre i nakon digestije krekeru, može se zaključiti da je došlo do značajnog povećanja ( $p < 0,05$ ) sadržaja hidrolizovanih proteina. To jasno

ukazuje na to da su obe vrste krekeri lako svarljivi. Generalno, veća svarljivost obogaćenih krekeri od leblebijinog brašna govori o tome da takav matriks više pogoduje uslovima i promenama sredine GIT-a.

- Elektroforetski profil uzoraka krekeri nakon *in vitro* digestije dokazuje njihovu svarljivost. Na elektroforetogramu se uočavaju trake ispod 20 kDa i 14 kDa, što znači da je došlo do hidrolize proteina.
- Sadržaj ukupnih fenola posle digestije svih krekeri značajno je veći ( $p < 0,05$ ) u odnosu na sadržaj pre digestije, i linearno raste sa porastom supstitucije proteina lišća brokolija.
- Hidrolizati obogaćenih krekeri nakon digestije imaju značajno veću ( $p < 0,05$ ) antioksidativnu aktivnost u odnosu na kontrolni uzorak. AA aktivnost hidrolizata nakon digestije posledica je kako oslobađanja sadržaja fenolnih jedinjenja koji su poznati antioksidanti, tako i prisustva dobijenih peptida hidrolizom ovog proteina. Prema tome, ovi krekeri pokazuju potencijalni biološki efekat nakon konzumacije jer protein izolovan iz lišća brokolija, poboljšava antioksidativna svojstva ove vrste prehrambenog proizvoda.

## 7. Literatura

Aard de Jong, Maaik Nieuwland (2011) Literature study on the properties of Rubisco, TNO report V9436.

Abubakar, A.R., Haque, M., 2020. Preparation of medicinal plants: basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *J. Pharm. BioAllied Sci.* 12 (1), 1–10.

Acosta-Estrada, B. A.; Gutiérrez-Urbe, J. A.; Serna-Saldívar, S. O., Bound phenolics in foods, a review, *Food Chem.* 152(2014) 46-55.

Adamez, J.D., Samino, E.G., Sanchez, E.V., Gonzalez, G.D., 2012. In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grapeseeds (*Vitis vinifera* L.). *Food Control* 24, 136–141.

Adebowale YA, Adeyemi IA, Oshodi AA (2005) Functional and physicochemical properties of

Adebowale YA, Adeyemi IA, Oshodi AA (2005) Functional and physicochemical properties of flours of six *Mucuna* species. *Afr J Biotechnol* 4(12):1461–1468.

Agarwal, M., Kumar, A., Gupta, R., Upadhyaya, S., 2012. Extraction of polyphenol, flavonoid from *Embllica officinalis*, *Citrus limon*, *Cucumis sativus* and evaluation of their antioxidant activity. *Orient. J. Chem.* 28, 993.

Agboola S, Darren Ng, Mills Dominic (2005) Characterization and functional properties of Australian rice protein isolates. *J Cereal Sci* 41:283-290. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.10.007>

Aggarwal, D., Sabikhi, L., & Sathish Kumar, M. H. (2016). Formulation of reducedcalorie biscuits using artificial sweeteners and fat replacer with dairy-multigrain approach. *NFS Journal*, 2, 1e7

Aguilera, J. M. i Stanlei, D. W. 1999. Microstructural principles of food processing and engineering, Springer Science & Business Media.



Ahmed, H. A. M., Ashraf, S. A., Awadelkareem, A. M., Alam, J., & Mustafa, A. I. (2019). Physico-chemical, textural and sensory characteristics of wheat flour biscuits supplemented with different levels of whey protein concentrate. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 7, 761e771.

Ajila, C.M., Rao, U.J.S.P., 2013. Mango peel dietary fibre: composition and associated bound phenolics. *J. Funct. Foods* 5, 444–450.

Aletor O, Oshodi AA, Ipinmoroti K (2002) Chemical composition of common leafy vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates. *Food Chem* 78:63–68. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00376-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00376-4)

Al-Farsi, M.A., Lee, C.Y., 2008. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chem.* 108, 977–985.

Alupului, A., Calinescu, I., Lavric, V., 2012. Microwave extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Sci. Bull. Series B* 74, 129–142.

Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A. L., & O'Mahony, J. A. (2017). The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 64, 1–12.

Amza T, Amadou I, Zhu K, Zhou H (2011) Effect of extraction and isolation on physicochemical and functional properties of an underutilized seed protein: gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*) *Food Res Int* 44(9):2843–2850. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.029>

Amza T, Amadou I, Zhu K, Zhou H (2011) Effect of extraction and isolation on physicochemical and functional properties of an underutilized seed protein: gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*). *Food Res Int* 44(9):2843–2850.

Ana Paula Ribeiro Barcelos de Castro, D. T. (2019). Effect of Freeze-Dried Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Leaf Supplementation on Biochemical and Anthropometrical Parameters in Overweight and Obese Individuals: a Pilot Study. *Plant Foods for Human Nutrition* 74, 232–234.

Angell, A. R., Paul, N. A., & de Nys, R. (2017). A comparison of protocols for isolating and concentrating protein from the green seaweed *Ulva ohnoi*. *Journal of Applied Phycology*, 29(2), 1011–1026. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-016-0972-7>.

Anna-Lovisa Nynäs (2018) White proteins from green leaves in food applications – A literature study, Introductory paper at the Faculty of Landscape Architecture, Horticulture and Crop Production Science, Alnarp, Sweden.

Añón, M. C., Sorgentini, D. A., & Wagner, J. R. (2001). Relationships between different hydration properties of commercial and laboratory soybean isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4852–4858.

Ansharullah, Hourigan, J. A., & Chesterman, C. F. (1997). Application of carbohydrases in extracting protein from rice bran. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74 (2), 141–146. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199706\)74:23.0.C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199706)74:23.0.C)

AOAC (1990) Official methods of analysis of the association of analytical chemists.

Appenroth, K. J., Sree, K. S., Böhm, V., Hammann, S., Vetter, W., Leiterer, M., et al. (2017). Nutritional value of duckweeds (*Lemnaceae*) as human food. *Food Chemistry*, 217, 266–273. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.116>.

Ares, A. M.; Nozal, M. J.; Bernal, J. L.; Bernal, J., Optimized extraction, separation and quantification of twelve intact glucosinolates in broccoli leaves, *Food Chem.* 152(2014) 66-74

Arnáiz, E.; Bernal, J.; Martín, M. T.; Nozal, M. J.; Bernal, J. L.; Toribio, L., Supercritical fluid extraction of free amino acids from broccoli leaves, *J. Chromatogr.* 1250(2012) 49-53.

Ayça Akyüz, Seda Ersus, 2021, Optimization of enzyme assisted extraction of protein from the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves for alternative plant protein concentrate production, *Food Chemistry*, 335, 127673, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127673>

Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *J. Food Eng.* 117, 426–436.

Badar KV, Kulkarni AU (2011) LPC is novel source of proteins for human health and nutrition. A review. *Curr Bot* 2(1):5–7. [https://scholar.google.com/scholar?q=LPC+is+novel+source+of+proteins+for+human+health+and+nutrition&hl=en&as\\_sdt=0&as\\_vis=1&oi=scholar](https://scholar.google.com/scholar?q=LPC+is+novel+source+of+proteins+for+human+health+and+nutrition&hl=en&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholar)

Badar KV, Kulkarni AU (2011) LPC is novel source of proteins for human health and nutrition. A review. *Curr Bot* 2(1):5–7.

Baiano, A., 2014. Recovery of biomolecules from food wastes—a review. *Molecules* 19, 14821–14842.

Balandrán-Quintana, R. R., Mercado-Ruiz, J. N., & Mendoza-Wilson, A. M. (2015). Wheat bran proteins: A review of their uses and potential. *Food Reviews International*, 31, 279–293.

Bals, B., Dale, B. E., Balan, V., Bergeron, C., Carrier, D. J., & Ramaswamy, S. (2012). Recovery of leaf protein for animal feed and high-value uses biorefinery co-products. John Wiley & Sons, Ltd.

Bals, B., Dale, B. E., Balan, V., Bergeron, C., Carrier, D. J., & Ramaswamy, S. (2012). Recovery of leaf protein for animal feed and high-value uses biorefinery co-products. John Wiley & Sons, Ltd.

Barbeau, W. E. (1990) Functional properties of leaf proteins: criteria required in food applications. *Italian journal of food science* 1990, 4, 213-225.

Barbeau, W. E.; Kinsella, J. E. (1988) Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) from green leaves - potential as food protein. *Food Rev. Int.*, 4 (1), 93-127.

Baysal, T., Ersus, S., Starmans, D.A., 2000. Supercritical (CO<sub>2</sub>) extraction of  $\beta$ -carotene and lycopene from tomato paste waste. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5507–5511.

Benelhadj S, Gharsallaoui A, Degraeve P, Attia H, Ghorbel D (2016) Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* protein isolate. *Food Chem* 194:1056–1063. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.133>

Benelhadj S, Gharsallaoui A, Degraeve P, Attia H, Ghorbel D (2016) Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate. *Food Chem* 194:1056–1063.

Berghout, J. A. M., Pelgrom, P. J. M., Schutyser, M. A. I., Boom, R. M., & van der Goot, A. J. (2015). Sustainability assessment of oilseed fractionation processes: A case study on lupin seeds. *Journal of Food Engineering*, 150, 117–124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.11.005>.

Betschar, A.; Kinsella, J. E. (1973) Extractability and Solubility of Leaf Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21 (1), 60-65.

Bhushan, S., Kalia, K., Sharma, M., Singh, B., Ahuja, P.S., 2008. Processing of apple pomace for bioactive molecules. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28, 285–296.

Bi, Y., Lu, Y., Yu, H., & Luo, L. (2019). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of bioactive compounds from *Sargassum henslowianum* using response surface methodology. *Pharmacognosy Magazine*, 15, 156–163. <https://www.phcog.com/text.asp?2019/15/60/156/250604.bioinformatics>. *Journal of Functional Foods*, 27, 262–273.

Birch, G. G., & Kemp, S. E. (1989). Apparent specific volumes and tastes of amino acids. *Chemical Senses*, 14(2), 249–258.

Boisen, S., Eggum, B. O. (1991). Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple- stomach animals. *Nutrition Research Reviews*, 4, 141-162.

Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., et al. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537–546. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.021>.

Bracco, S., Calicioglu, O., Juan, M.G.S., Flammini, A., 2018. Assessing the contribution of bioeconomy to the total economy: are view of national frameworks. *Sustainability* 10, 1698.

Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Protein Utiliyng the Principle of Protein-Dze Binding. In *analytical chemistry* (pp. 248-254). Athens:

Reproduction Research Laboratories, Department of Biochemistry, University of Georgia, Athens, Georgia 30602.

Branden C. and Tooze J. (1999), Introduction to protein structure, 2nd edition, New York, Garland.

Brasil (1978). Ministerio da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (Resolução - CNNPA nº 12, de 24 de julho de 1978). Brasília: Diário Oficial da União.

Bučko S, Katona J, Popović Lj, Vaštag Ž, Petrović L, Vučinić-Vasić M (2015) Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *LWT-Food Sci. Technol.* 64:609-615. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2015.06.054>

Bučko, S. (2020). Adsorpciona i emulgujuća svojstva proteinskog izolata i hidrolizata semena tikve (*Cucurbita pepo*). Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.

Cabello-Hurtado, F.; Gicquel, M.; Esnault, M.-A., Evaluation of the antioxidant potential of cauliflower (*Brassica oleracea*) from a glucosinolate content perspective, *Food Chem.* 132(2012) 1003-1009.

Čakarević J., Vidović S., Vladić J., Gavarić A., Jokić S., Pavlović N., Blažić M., Popović Lj. (2019). Production of bio-functional protein through revalorization of apricot kernel cake. *Foods*, 8, 318.

Calderon-Chiu C, Calderón-Santoyo M, Herman-Lara E, RagazzoSanchez JA (2021) Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* lam) leaf as a new source to obtain protein hydrolysates: physicochemical characterization, techno-functional properties and antioxidant capacity. *Food Hydrocoll* 112:106319. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106319> 13.

Campbell, K. A., & Glatz, C. E. (2010). Protein recovery from enzyme-assisted aqueous extraction of soybean. *Biotechnology Progress*, 26(2), 488–495. <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.341>.

Cao, H., Sun, R., Shi, J., Li, M., Guan, X., Liu, J., Huang, K., & Zhang, Y. (2021). Effect of ultrasonic on the structure and quality characteristics of quinoa protein oxidation aggregates. *Ultrasonic Sonochemistry*, 77, 105685. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105685>

Cartea, M. E.; Francisco, M.; Soengas, P.; Velasco, P., Phenolic Compounds in Brassica Vegetables, *Molecules*. 16(2010) 251-280.

Cartea, M. E.; Francisco, M.; Soengas, P.; Velasco, P., Phenolic Compounds in Brassica Vegetables, *Molecules*. 16(2010) 251-280.

Cattaneo, S., Masotti, F., Silvetti, T., Hidalgo, A., & De Noni, I. (2019). Effect of dairy ingredients on the heat damage and the in vitro digestibility of infant biscuits. *European Food Research and Technology*, 245, 2489e2497

Celotti, E., Barahona, M. S. O., Bellantuono, E., Cardona, J., Roman, T., Nicolini, G., & Natolino, A. (2021). High-power ultrasound on the protein stability of white wines: Preliminary study of amplitude and sonication time. *LWT-Food Science and Technology*, 147, 111602. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111602>

Cerda, A.; Martínez, M. E.; Soto, C.; Poirrier, P.; Perez-Correa, J. R.; Vergara-Salinas, J. R.; Zúñiga, M. E., The enhancement of antioxidant compounds extracted from *Thymus vulgaris* using enzymes and the effect of extracting solvent, *Food Chemistry*. 139(2013) 138-143.

Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S., Marc, I. (2007). Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of rapeseed hydrolysates. *Process Biochemistry*, 42, 1419-1428.

Chalamaiah, M., Keskin Ulug, S., Hong, H., & Wu, J. (2019). Regulatory requirements of bioactive peptides (protein hydrolysates) from food proteins. *Journal of Functional Foods*, 58, 123–129. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2019.04.050>

Chang, C.J., Chiu, K.L., Chen, Y.L., Chang, C.Y., 2000. Separation of catechins from green tea using carbon dioxide extraction. *Food Chem*. 68, 109–113.

Chantaro, P., Devahastin, S., Chiewchan, N., 2008. Production of antioxidant high dietary fiber powder from carrot peels. *LWT - Food Sci. Technol. (LebensmittelWissenschaft - Technol.)* 41, 1987–1994.

Charoensit, P., Sawasdipol, F., Tibkawin, N., Suphrom, N., Khorana, N., 2021. Development of natural pigments from *Tectona grandis* (teak) leaves: agricultural waste material from teak plantations. *Sustain. Chem. Pharm.* 19, 100365.

Chen W, Qiu Y (2003) Leaf protein's utilization status and its prospect. *Food Sci* 24(2):158–161.

Chen, Y., Li, M., Dharmasiri, T. S. K., Song, X., Liu, F., & Wang, X. (2020). Novel ultrasonic-assisted vacuum drying technique for dehydrating garlic slices and predicting the quality properties by low field nuclear magnetic resonance. *Food Chemistry*, 15(306), 125625. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125625>

Chiesa, S., & Gnansounou, E. (2011). Protein extraction from biomass in a bioethanol refinery—possible dietary applications: Use as animal feed and potential extension to human consumption. *Bioresource Technology*, 102(2), 427–436. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.125>

Chung, C and McClements, D. J. (2014) Structure–function relationships in food emulsions: improving food quality and sensory perception. *Food structure*, 1, 106- 126.

Clemente, A. (2000): Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science& Technology*, 11, 254-262.

Coldebella, P. F., Gomes, S. D., Evarini, J. A., Cereda, M. P., Coelho, S. R. M., & Coldebella, A. (2013). Evaluation of protein extraction methods to obtain protein concentrates from Cassava leaf. *Engenharia Agricola*, 33(6), 1223–1233.

Coll, M.D., Coll, L., Laencina, J., Barberan, F.T., 1998. Recovery of flavanones from wastes of industrially processed lemons. *Eur. Food Res. Technol.* 206, 404–407.

Conde JM, del Mar Yust Escobar M, Pedroche Jimenez JJ, Rodriguez FM, Rodriguez Patino JM. 2005. Effect of enzymatic treatment of extracted sunflower proteins on solubility, amino acid composition, and surface activity. *J Agric Food Chem* 53:8038–45.

Connell, J. and Houseman, R.A. (1977). In *Green Crop Fractionation* (Wilkins, r.J., Ed.), *Brit. Grassld. Soc. Occas. Symp.* pp.57.

Corrales, M., Toepfl, S., Butza, P., Knorr, D., Tauscher, B., 2008. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.* 9, 85–91.

Coultate, T.P. (1984). *Alimentos – Química de sus componentes*. Editorial Acribia SA, Zaragoza.

Couto, S.R., 2008. Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. *Biotechnol. J.* 3, 859–870.

D'alvise, N., Lesueur-Lambert, C., Fertin, B., Dhulster, P., & Guillochon, D. (2000). Removal of polyphenols and recovery of proteins from alfalfa white protein concentrate by ultrafiltration and adsorbent resin separations. *Separation Science and Technology*, 35(15), 2453–2472.

Dabbour, M., Jiang, H., Mintah, B. K., Wahia, H., & He, R. (2021). Ultrasonic-assisted protein extraction from sunflower meal: Kinetic modelling, functional and structural traits. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 74, 102824. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102824>

Damodaran, S. (1988). Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect of gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(2), 262–268.

Damodaran, S. (1996) Functional properties. In: NAKAI, S. & MODLER, H. W. (eds.) *Food proteins: Properties and characterization*. John Wiley & Sons.

Damodaran, S. (1997). *Food proteins and their applications*, CRC Press.

Damodaran, S. (1997). Food proteins: An overview. In S. Damodaran & A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their applications* (pp. 1–21). New York: Marcel Dekker.

Damodaran, S. (1997). Food proteins: An overview. In S. Damodaran & A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their applications* (pp. 1–21). New York: Marcel Dekker.

Damodaran, S. (2000). Aminoácidos, péptidos y proteínas. In: Fennema, O.R. (Dir), *Química de los Alimentos*. Editorial Acribia SA, Zaragoza, 381-511.



Damodaran, S. (2005). Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of food science*, 70, R54-R66.

Damodaran, S. , (1996) Amino acids, peptides, and proteins in *Food Chemistry*, 3rd edition, ed. by Fennema OR. Marcel Dekker, New York, pp. 365–379.

Dapcevic-Hadnadev, T., Hadnadev, M., Pojic, M., & Balandran-Quintana, R. R. (2018). The healthy components of cereal by-products and their functional properties.

Daroit, D. J., & Brandelli, A. (2021). In vivo bioactivities of food protein-derived peptides – A current review. *Current Opinion in Food Science*, 39, 120–129. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2021.01.002>

Dehghan-Shoar, Z., Hardacre, A. K., Meerdink, G., & Brennan, C. S. (2011). Lycopene extraction from extruded products containing tomato skin. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(2), 365–371.

Deng, G.F., Shen, C., Xu, X.R., Kuang, R.D., Guo, Y.J., Zeng, L.S., Gao, L.L., Lin, X., Xie, J. F., Xia, E.Q., 2012. Potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 8308–8323.

Dewanji, A. (1993). Amino acid composition of leaf proteins extracted from some aquatic weeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*®, 41(8), 1232–1236.

Dick, M., Limberger, C., Thys, R.C.S., de Oliveira Rios, A., Flôres, S.H, 2020. Mucilage and cladode flour from cactus (*Opuntia monacantha*) as alternative ingredients in gluten-free crackers. *Food Chem.* 314, 126178.

Dickinson, E. (2010) Food emulsions and foams: stabilization by particles. *Current opinion in colloid & interface Science*, 15, 40-49.

Dickinson, E. (2016) Biopolymer-based particles as stabilizing agents for emulsions and foams. *Food hydrocolloids*.

Dickinson, E., & Hong, S.-T. (1994). Surface coverage of b-lactoglobulin at the oil–water interface: Influence of protein heat treatment and various emulsifiers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(8), 1602–1606

Diers, B.W., Keim, P., Feh, W.R., Shoemaker, R.C., 1992. RFLP analysis of soybean seed protein and oil content. *Theor. Appl. Genet.* 83, 608–612.

Digman, M. F., Runge, T. M., Shinnors, K. J., & Hatfield, R. D. (2013). Wet fractionation for improved utilization of Alfalfa leaves. *Biological Engineering Transactions*, 6(1), 29–42.

Dijkstra, D. S.; Linnemann, A. R.; Van Boekel, T. A. J. S. (2003) Towards Sustainable Production of Protein-Rich Foods: Appraisal of Eight Crops for Western Europe. PART II: Analysis of the Technological Aspects of the Production Chain. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (5), 481-506.

Dominguez-Perles, R.; Moreno, D. A.; Carvajal, M.; Garcia-Viguera, C., Composition and antioxidant capacity of a novel beverage produced with green tea and minimally-processed byproducts of broccoli, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 12(2011) 361-368.

Douillard, R.; de mathan, O. (1994) Leaf protein for food use: potential of Rubisco. In *New and developing sources of food protein*,; pp 307-342.

dr Ljiljana Popović, *PROTEINI I BIOHEMIJSKE TRANSFORMACIJE*, Monografija, 2022

Du MX, Xie JH, Gong B et al (2018) Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of Mung bean protein. *Food Hydrocoll* 76:131–140. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.003>

Edwards, R. H., Miller, R. E., Fremery, D. d., Knuckles, B. E., Bickoff, E. M., & Kohler, G. O. (1975). Pilot plant production of an edible white fraction leaf protein concentrate from alfalfa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(4).

El-Adawy, T.A. (2000): Functional properties and nutritional quality of acetylated and succinylated mung bean protein isolate. *Food Chemistry*, 70(1), 83-91.

European Commission, 2015. EIP- AGRI Workshop Opportunities for Agriculture and Forestry in the Circular Economy. Workshop Report. 28-29 October 2015. Brussels, Belgium.

Fameau, A.-L. and Salonen, A. (2014) Effect of particles and aggregated structures on the foam stability and aging. *Comptes rendus physique*, 15, 748-760.

Fathi, P., Nasab, M. M., Kouhdasht, A. M., & Khalesi, M. (2021). Generation of hydrolysates from rice bran proteins using a combines ultrasonication-Alcalase hydrolysis treatment. *Food Bioscience*, 42, 101110. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101110>

Fernandes, P., & Carvalho, F. (2017). Microbial enzymes for the food industry. *Biotechnology of Microbial Enzymes Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, 19, 513–544.

Ferraz, C.A., Fontes, R.L.S., Fontes-Sant'Ana, G.C., Calado, V., Lopez, E.O., RochaLeao, M.H.M., 2019. Extraction, modification, and chemical, thermal and morphological characterization of starch from the agro-industrial residue of mango (*Mangifera indica* L) var. Uba, *Starch* 71, 1800023.

Figuroa, G.A., Homann, T., Rawel, H.M., 2016. Coffee production wastes: potentials and perspectives. *Austin Food Sci* 1, 1014.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) & Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), 2019. Background Notes on Sustainable, Productive and Resilient Agro-Food Systems: Value Chains, Human Capital, and the 2030 Agenda. A Report to the G20 Agriculture Deputies.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2017. Strategic Work of FAO for Sustainable Food and Agriculture.

*Food Chem* 153:353–360. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.058>

FoodInfo.us, 2011. USDA National Nutrient Database for Standard Reference 2010.

Franklin, H.C., Yeison, M.M., Henry, L.M., Jorgelina, P., 2017. Starch extraction potential from plantain peel wastes. *J. Environ. Chem. Eng.* 5, 4980–4985.

Friedman, M. (1996). Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 6–29.

FSAI (2010). The Food Safety Authority of Ireland. Accuracy of Nutrition Labelling of Pre- Packaged Food in Ireland. <http://www.thehealthwell.info/node/90534>

Fukushima, D. (1991). Structures of plant storage proteins and their function. *Food Reviews International*, 7(3), 353-381.

Gani, A., Broadway, A. A., Ahmad, M., Ashwar, B. A., Wani, A. A., Wani, S. M., et al. (2015). Effect of whey and casein protein hydrolysates on rheological, textural and sensory properties of cookies. *Journal of Food Science & Technology*, 52, 5718e5726

Ge, Y., Sun, A., Ni, Y., & Cai, T. (2000). Some nutritional and functional properties of defatted wheat germ protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6215– 6218.

Geetha Shree Nagraj, A. C. (2020). Nagraj, G. S., Chouksey, A., Jaiswal, S., & Jaiswal, A. K. (Broccoli. Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables, 5–17. In A. C. Geetha Shree Nagraj, *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables* (pp. 5-17). Kharagpur, India.

Gerliani, N., Hammami, R., Aider, M., 2020. Extraction of protein and carbohydrates from soybean meal using acidic and alkaline solutions produced by electroactivation. *Food Sci. Nutr.* 8, 1125–1138.

González-Pérez, S., van Koningsveld, G. A., Vereijken, J. M., Merck, K. B., Gruppen, H., and Voragen, A. G. J. (2005). Emulsion properties of sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2261–2267.

González-Pérez, S., Vereijken, J. M. (2007). Sunflower proteins: Overview of there psysicochemical, structural and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2173-2191.

González-Montoya M, Hernández-Ledesma B, Mora-Escobedo R, Martínez-Villaluenga C (2018) Bioactive peptides from germinated soybean with anti-diabetic potential by inhibition of dipeptidyl peptidase-IV,  $\alpha$ -amylase, and  $\alpha$ -glucosidase enzymes. *Int J Mol Sci* 19:2883.

Goodman, B.A., 2020. Utilization of waste straw and husks from rice production: a review. *J. Biores. Bioprod.* 5, 143–162.

Gopalakrishnan, L., Doriya, K., & Kumar, D. S. (2016). Moringa oleifera: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness*, 5(2), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.04.001>.

Graham, D. E., & Philips, M. C. (1976). The conformation of proteins at the air–water interface and their role. In R. J. Akers (Ed.), *Stabilizing foams. Foams* (pp. 237–255). New York: Academic Press.

Graminha, E.B.N., Goncalves, A.Z.L., Pirota, R.D.P.B., Balsalobre, M.A.A., Silva, R., Gomes, E., 2008. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 144, 1–22.

Guan X, Yao H, Chen Z, Shan L, Zhang M (2007) Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin. *Food Chem* 101:163–170. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.011>

Guerrero, L.C., Martin, E.B., Antonio, A.M., Mondragon, E.G., Ancona, D.B., 2016. Some physicochemical and rheological properties of starch isolated from avocado seeds. *Int. J. Biol. Macromol.* 86, 302–308.

Guo, J.-T., Lee, H.-L., Chiang, S.-H., Lin, F.-I., & Chang, C.-Y. (2001). Antioxidant properties of the extracts from different parts of broccoli in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*, 9(2), 96–101.

Han, J., Janz, J. A. M., & Gerlat, M. (2010). Development of gluten-free cracker snacks using pulse flours and fractions. *Food Research International*, 43(2), 627–633. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.015>.

He, H. L., Liu, D., & Ma, C. B. (2013). Review on the angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitor peptides from marine proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169, 738–749.

Hegg, P. O. (1982). Conditions for the formation of heat-induced gels of some globular food proteins. *Journal of Food Science*, 47(4), 1241–1244.

Heimler, D.; Vignolini, P.; Dini, M. G.; Vincieri, F. F.; Romani, A., Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties, *Food Chem.* 99(2006) 464-469.

Heng, L. (2005): Flavour Aspects of pea and its Proteins Preparation in Relation to Novel Protein Food. <http://library.wur.nl/wda/dissertations/dis3766>.

Hermansson, A.-M. (1994). Microstructure or protein gels related to functionality. In: YADA, R. Y., JACKMAN, R. L. & SMITH, J. L. (eds.) Protein structure-function relationships in foods. Springer science+business media New York.

Hernandez, Y., Lobo, M.G., Gonzalez, M., 2009. Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. *Food Chem.* 114, 734–741.

Hernandez-Ledesma B, Contreras M, Recio I (2011) Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv Colloid Interface Sci* 165:23–35

Heshmati, A., 2015. A Review of the Circular Economy and its Implementation. IZA Discussion. Paper No. 9611.

Hettiarachchy, N. S., & Kalapathy, U. (1998). Functional properties of soy proteins. In J. R. Whitaker, F. Shahidi, A. Lo'pez-Mungui'a, R. Y. Yada, & G. Fuller (Eds.), *Functional properties of proteins and lipids*. ACS Symposium Series (708, pp. 80–95). Washington, DC: American Chemical Society.

Hettiarachchy, N. S., & Ziegler, G. R. (1994). Structure–function relationship of food protein. In N. S. Hettiarachchy & G. R. Ziegler (Eds.), *Protein functionality in food systems* (pp. 1–38). New York: Marcel Dekker.

Hettiarachchy, N., Kannan, A., Schäfer, C., & Wagner, G. (2013). Gelling of plant based proteins product design and Engineering: Formulation of gels and pastes.

Ho, L.-H., & Abdul Latif, N. W. binti (2016). Nutritional composition, physical properties, and sensory evaluation of cookies prepared from wheat flour and pitaya (*Hylocereus undatus*) peel flour blends. *Cogent Food & Agriculture*, 2. Article 1136369.

Hojilla-Evangelista MP, Selling GW, Hatfield R, Dugman M (2016) Extraction, composition, and functional properties of dried alfalfa (*Medicago sativa* L.) leaf protein. *J Sci Food Agric* 97:882–888. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7810>

Hojilla-Evangelista MP, Sessa DJ and Mohamed A, (2004) Functional properties of soybean and lupin protein concentrates produced by ultrafiltration–diafiltration. *J Am Oil Chem Soc* 81:1153–1157.

Huynh, N. T.; Smaghe, G.; Gonzales, G. B.; Van Camp, J.; Raes, K., Enzyme-Assisted Extraction Enhancing the Phenolic Release from Cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) Outer Leaves, *J. Agric. Food Chem.* 62(2014) 7468-7476.

Hwang, E.Y., Song, Q., Jia, G., Specht, J.E., Hyten, D.L., Costa, J., Cregan, P.B., 2014. A genome-wide association study of seed protein and oil content in soybean. *BMC Genom.* 15, 1–12.

Iñiguez-Covarrubias, G.; Lange, S. E.; Rowell, R. M., Utilization of byproducts from the tequila industry: part 1: agave bagasse as a raw material for animal feeding and fiberboard production, *Bioresour. Technol.* 77(2001) 25-32.

Jain, T., Jain, V., Pandey, R., Vyas, A., Shukla, S.S., 2009. Microwave assisted extraction for phytoconstituents—an overview. *Asian J. Res. Chem.* 2, 19–25.

Jeewanthi, R. K. C., Lee, N.-K., & Paik, H.-D. (2015). Improved functional characteristics of whey protein hydrolysates in food industry. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35, 350e359.

Jeeyup (Jay) Han, Jennifer A.M. Janz, Mindy Gerlat Development of gluten-free cracker snacks using pulse flours and fractions *Food Research International* 43 (2010) 627–633

Jelena Čakarević, IN VITRO DIGESTIJA I NJEN UTICAJ NA AKTIVNOST, STABILNOST I DOSTUPNOST BIOLOŠKI AKTIVNIH JEDINJENJA, Doktorska disertacija, 2021

Jensen-Jarolim, E. (2006). Food safety: In vitro digestion tests are non-predictive for allergenic potential of food in stomach insufficiency. *Immunology Letters*, 102, 118–119.

Joshi, R.N. (1983). In Leaf protein concentrates (Telek L. and Graham, H.D. Ed.) AVI Publishing Company. Inc., West Port, Connecticut, pp. 673.

Joshi, V.K., Kumar, A., Kumar, V., 2012. Antimicrobial, antioxidant and, phytochemicals from fruit and vegetable wastes: a review. Intl. Food Ferm. Technol. 2, 123–136.

Jung, S., Lamsal, B. P., Stepien, V., Johnson, L. A., & Murphy, P. A. (2006). Functionality of soy protein produced by enzyme assisted extraction. Journal of the American Oil Chemists' Society, 83(1), 71–78.

Kaderides, K., Mourtzinos, I., Goula, M. A. (2020). Stability of pomegranate peel polyphenols encapsulated in orange juice industry by-product and their incorporation in cookies. Food Chemistry, 310.

Kammes KL, Bals BD, Dale BE, Allen MS (2011) Grass leaf protein, a coproduct of cellulosic ethanol production, as a source of protein livestock. Anim Feed Sci Technol 164(1–2):79–88.

Kanazawa, K., Sakakibara, H., 2000. High content of dopamine, a strong antioxidant, in cavendish banana. J. Agric. Food Chem. 48, 844–848.

Karami, Z., & Akbari-adergani, B. (2019). Bioactive food derived peptides: A review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. Journal of Food Science & Technology, 56(2), 535–547.

Katalinic, V., Mozina, S.S., Skroza, D., Generalic, I., Abramovic, H., Milos, M., Ljubenkovic, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinic, P., Boban, M., 2010. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 Vitis vinifera varieties grown in dalmatia (Croatia). Food Chem. 119, 715–723.

Kato, A., & Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. Biochimica et Biophysica Acta, 624(1), 13–20.

Kato, A., Fujishige, T., Matsudomi, N., & Kobayashi, K. (1985). Determination of emulsifying properties of some proteins by conductivity measurements. Journal of Food Science, 50, 56–58, 62.



Kaur M, Singh N (2007) Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chem.* 102:366–374. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.029>

Kaur, M., Singh, N., Sandhu, K.S., Guraya, H.S., 2004. Physicochemical, morphological, thermal and rheological properties of starches separated from kernels of some Indian mango cultivars (*Mangifera indica* L.). *Food Chem.* 85, 131–140.

Khoddami, A., Wilkes, M.A., Roberts, T.H., 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 18, 2328–2375.

Kilara, A., & Sharkasi, T. Y. (1986). Effects of temperature on food proteins and its implications on functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 23(4), 323–395.

Kim, K-H., Renkem, J. M. S., & van Vliet, T. (2001). Rheological properties of soybean protein isolate gels containing emulsion droplets. *Food Hydrocolloids*, 15(3), 285–302.

Kinsella, J. E. (1976). Functional properties of food proteins: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7, 219–280.

Kinsella, J. E. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56, 242–258.

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

Kinsella, J. E. (1984). Milk proteins: Physicochemical and functional properties. *CRC Critical Review on Food and Science Nutrition*, 21, 197–262.

Kiskini, A., Vissers, A., Vincken, J. P., Gruppen, H., & Wierenga, P. A. (2016). Effect of plant age on the quantity and quality of proteins extracted from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(44), 8305–8314.

Klich, M.A., 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Mol. Plant. Pathol.* 1 713–722.

Knuckles, B. E.; Kohler, G. O. (1982) Functional-Properties of Edible Protein Concentrates from Alfalfa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30 (4), 748-752.

Knuckles, B.E., Spencer, R.R., Lazar, M.E., Bickoff, E.M. and Kohler, G.O. (1970). *J. agric. Fd. Chem.* 18: 1086.

Kołodziejczyk, K., Markowski, J., Kosmala, M., Krol, B., Płocharski, W., 2007. Apple pomace as a potential source of nutraceutical products. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 57, 291–295.

Kotecka-Majchrzak K, Sumara A, Fornal E, Montowska M (2020) Oilseed proteins – properties and application as a food ingredient. *Trends Food Sci Technol* 106:160–170.

Krase, J.-P., Schultz, M., & Dudek, S. (2002). Effect of extraction conditions on composition, surface activity and rheological properties of protein isolates from flaxseed (*Linum usitatissimum* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(9), 970–976.

Krause, J.-P., Bagger, Ch., & Schwenke, K. D. (2001). Rheological properties of modified lupin proteins. *Nahrung/Food*, 45(6), 412–415.

Kuk, M.S., Dowd, M.K., 1998. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of rice bran. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 623–628.

Kumar, A., Elavarasan, K., Hanjabam, M. D., Binsi, P. K., Mohan, C. O., Zynudheen, A. A., et al. (2019). Marine collagen peptide as a fortificant for biscuit: Effects on biscuit attributes. *LWT-Food Science and Technology*, 109, 450–456. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.04.052>

Kuntz, I. D., Jr., & Kauzmann, W. (1974). Hydration of proteins and polypeptides. *Advances in Protein Chemistry*, 28, 239–345.

Lacerda, L.G., Colman, T.A.D., Bauab, T., Filho, M.A.S.C., Demiate, I.M., de Vasconcelos, E.C., Schnitzler, E., 2014. Thermal, structural and rheological properties of starch from avocado seeds (*Persea americana*, Miller) modified with standard sodium hypochlorite solutions. *J. Therm. Anal. Calorim.* 115, 1893–1899.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 *Nature* 227:680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Lafarga, T., Acíen-Fernández, F. G., & Garcia-Vaquero, M. (2020). Bioactive peptides and carbohydrates from seaweed for food applications: Natural occurrence, isolation, purification, and identification. *Algal Research*, 48, 101909.

Laguna, L., Varela, P., Salvador, A., Sanz, T., & Fiszman, S. M. (2012). Balancing texture and other sensory features in reduced fat short-dough biscuits. *Journal of Texture Studies*, 43, 235e245.

Lam, R. S. H., & Nickerson, M. T. (2013). Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. *Food Chemistry*, 141(2), 975–984. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.038>.

Lambert, N., & Yarwood, J. N. (1992). Engineering legume seed storage proteins. In P. R. Shewry, & S. Guteridge, *Plant protein engineering* (167-187). London, UK: Cambridge University Press.

Lamsal BP, Koegel RG, Gunasekaran S (2007) Some physicochemical and functional properties of alfalfa soluble leaf proteins. *LWT-Food Sci Technol* 40:1520–1526. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.11.010> 12.

Langton, M. and Hermansson, A.-M. (1992). Fine-stranded and particulate gels of  $\beta$ -lactoglobulin and whey protein at varying pH. *Food Hydrocolloids*, 5, 523-539.

Langton, M. and Hermansson, A.-M. (1996). Image analysis of particulate whey protein gels. *Food Hydrocolloids*, 10, 179-191.

Larissa Slongo Faccioli, Manuela Poletto Klein, Gabriela Ramos Borges, Carolina Silveira Dalanhof, Isabel Cristina Kasper Machado, Juliano Garavaglia, Simone Morelo Dal Bosco, Development of crackers with the addition of olive leaf flour (*Olea europaea* L.): Chemical and sensory characterization *LWT - Food Science and Technology* 141 (2021) 110848

Latif, S., Anwar, F., 2009. Physicochemical studies of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil using enzyme-assisted cold-pressing. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111, 1042–1048.

Laufenberg, G., Schulze, N., Waldron, K., 2009. A modular strategy for processing of fruit and vegetable wastes into value-added products. In: Waldron, K.W. (Ed.), *Handbook of*

Waste Management and Co-product Recovery in Food Processing. Woodhead Publishing Limited, New York, N.Y., pp. 286–353

Laufenberg, G., Schulze, N., Waldron, K., 2009. A modular strategy for processing of fruit and vegetable wastes into value-added products. In: Waldron, K.W. (Ed.), Handbook of Waste Management and Co-product Recovery in Food Processing. Woodhead Publishing Limited, New York, N.Y., pp. 286–353

Lebovka, N.I., Bazhal, M.I., Vorobiev, E., 2002. Estimation of characteristic damage time of food materials in pulsed-electric fields. *J. Food Eng.* 54, 337–346.

Leng, R. A., Stambolie, J. H., & Bell, R. (1995). Duckweed - a potential high-protein feed resource for domestic animals and fish. *Livestock Research for Rural Development*, 7(1).

Lesk A. (2001), *Introduction to Protein Architecture*, Oxford, University Press.

Li Y, Yu J (2015) Research progress in structure–activity relationship of bioactive peptides. *J Med Food* 18:147–156.

Li, D., Zhu, F., 2017. Physicochemical properties of kiwifruit starch. *Food Chem.* 220, 129–136.

Lignitto L, Cavatorta V, Balzan S, Gabai G, Galaverna G, Novelli E (2010) Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago d’alpe cheese. *Int Dairy J* 20:11.

Lin, L.-Z.; Harnly, J. M., Identification of the Phenolic Components of Collard Greens, Kale, and Chinese Broccoli, *J. Agric. Food Chem.* 57(2009) 7401-7408.

Lin, L.-Z.; Harnly, J. M., Phenolic Component Profiles of Mustard Greens, Yu Choy, and 15 Other Brassica Vegetables, *J. Agric. Food Chem.* 58(2010) 6850-6857

Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (1996). Functional properties of veal bone hydrolyzates. *Journal of Food Science*, 61(4), 712–716, 720.

Llorach, R.; Espín, J. C.; Tomás-Barberán, F. A.; Ferreres, F., Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Byproducts as a Potential Source of Health-Promoting Antioxidant Phenolics, *J. Agric. Food Chem.* 50(2002) 3458-3464.

Lowry OH, Rosenbrough, NJ, Fair AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagents. *J Biol Chem* 193:265-275.

Lu, P. S.; Kinsella, J. E.(1972) Extractability and Properties of Protein from Alfalfa Leaf Meal. *Journal of Food Science*, 37 (1), 94-99.

Lucia Panzella, Federica Moccia, Rita Nasti, Stefania Marzorati, Luisella Verotta, and Alessandra Napolitano Bioactive Phenolic Compounds From Agri-Food Wastes: An Update on Green and Sustainable Extraction Methodologies <https://doi.org/10.3389%2Ffnut.2020.00060>

Luz M. Alzate T, D. G. (2017). the profile of bioactive substances in ten vegetable and fruit by-products from a food supply chain in colombia. *sustainable production and consumption* , 37-43.

Madurwar, M. V.; Ralegaonkar, R. V.; Mandavgane, S. A., Application of agro-waste for sustainable construction materials: A review, *Construction and Building Materials*. 38(2013) 872-878.

Mahloko, M. L., Silungwe, H., Mashau, E. M., Kgatla, E. T. (2019). Bioactive compounds, antioxidant activity and physical characteristics of wheat-prickly pear and banana biscuits. *Heliyon*, 5.

Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D.R., Carle, R., 2009. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chem*. 112, 551–559.

Malhotra, A., & Coupland, J. N. (2004). The effect of surfactant on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 18, 101–108.

Mandal, S. & Mandal, R.K. (2000). Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering, *Current Science*, 79 (5), 576-587.

Manoj Kumar , Maharishi Tomar, Jayashree Potkule, Reetu Verma, Sneha Punia, Archana Mahapatra e , Tarun Belwal f , Anil Dahuja g , Shourabh Joshi h , Mukesh K. Berwal i , Varsha Satankarj , Anilkumar G. Bhoite, Ryszard Amarowicz l , Charanjit Kaur, John F. Kennedy, 2021,

Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations, *Food Hydrocolloids* 115, 106595 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106595>

Manoj Kumar, Maharishi Tomar, Sneha Punia, Jyoti Dhakane-Lad, Sangram Dhumal, Sushil Changan, Marisennayya Senapathy, Mukesh K. Berwal, Vellaikumar Sampathrajan, Ali A.S. Sayed, Deepak Chandran, R. Pandiselva, Nadeem Rais, Dipendra Kumar Mahato, Shashikant Shiddappa Udikeri, Varsha Satankar, T. Anitha, Reetu, Radha, Surinder Singh, Ryszard Amarowicz, John F. Kennedy v (2022) Plant-based proteins and their multifaceted industrial applications. *LWT - Food Science and Technology* 154 112620

Manzoor, M., Singh, J., & Gani, A. (2021). Characterization of apple (*Malus domestica*) seed flour for its structural and nutraceutical potential. *LWT-Food Science and Technology*, 151, 112138. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112138>

Mariani, M., Oliveira, V. R., Faccin, R., Rios, A. O., & Venzke, J. G. (2015). Elaboração e avaliação de biscoitos sem glúten a partir de farelo de arroz e farinhas de arroz e de soja. *Brazilian Journal of Food Technology*, 18, 70–78.

Marques, G. de A., S~ ao Jose, J. F. B. de, Silva, D. A., & Silva, E. M. M. da (2016). Whey protein as a substitute for wheat in the development of no added sugar cookies. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 67, 118e126.

Martin, G., Savaget, P., Bocken, N., Hultink, E.J., 2017. The Circular Economy – a new sustainability paradigm? *J. Clean. Prod.* 143, 757–768.

Maryam Nikbakht Nasrabadi, Ali Sedaghat Doost, Raffaele Mezzenga, (2021) Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products *Food Hydrocolloids*, 118, September 2021, 106789 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106789>

Mattos (2002) Mattos, C. (2002). Protein–water interactions in a dynamic world. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(4), 203–208.

McClements, D. J. 2015. *Food emulsions: principles, practices, and techniques*, CRC press.

Meng, Y., Liang, Z., Zhang, C., Hao, S., Han, H., Du, P., Li, A., Shao, H., Li, C., & Liu, L. (2021). Ultrasonic modification of whey protein isolate: Implications for the structural and

functional properties. *LWT-Food Science and Technology*, 152, 112272. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112272>

M'hiri, N., Ioannou, I., Ghoul, M., & Boudhrioua, N. M. (2014). Extraction methods of citrus peel phenolic compounds. *Food Reviews International*, 30(4), 265–290.

Milad Hadidi, Fatemeh Baradaran Khaksar, Jordi Pagana, Albert Ibarza (2020) Application of Ultrasound-Ultrafiltration-Assisted alkaline isoelectric precipitation (UUAIP) technique for producing alfalfa protein isolate for human consumption: Optimization, comparison, physicochemical, and functional properties. *Food Research International* [Volume 130](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108907), April 2020, 108907 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108907>

Milica N. Perovic, Zorica D. Knezevic Jugovic, Mirjana G. Antov, 2020, Improved recovery of protein from soy grit by enzyme-assisted alkaline extraction, *Journal of Food Engineering*, 276, 109894, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109894>

Millerd, A., *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1975, 26, 56–72.

Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakava, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, N.C., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W., Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food and Function*, 5, 1113-1124.

Mitidieri, F. E., & Wagner, J. R. (2002). Coalescence of o/w emulsions stabilized by whey and isolate soybean proteins. Influence of thermal denaturation, salt addition and competitive interfacial adsorption. *Food Research International*, 35, 547–557.

Mohanty DP, Mohapatra S, Misra S, Sahu PS (2016) Milk derived bioactive peptides and their impact on human health - a review. *Saudi J Biol Sci* 23(5):577–583.

Montelongo, R.G., Lobo, M.G., Gonzalez, M., 2010. Antioxidant activity in banana peel extracts: testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chem.* 119, 1030–1039.

Morales FJ, Jimenez-Pérez S (2001) Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to color and fluorescence. *Food Chem* 72:119-125. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00239-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00239-9)

Morr, C. V. (1990). Current status of soy protein functionality in food systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67(5), 265–271.

Moure A, Sineiro J, Domínguez H, Parajo JC (2006) Functionality of oilseed protein products: a review. *Food Res Int* 39(9):945–963.

Murthy, P.S., Naidu, M.M., 2012. Sustainable management of coffee industry byproducts and value addition-A review. *Resour. Conserv. Recycl.* 66, 45–58.

Nadar, S. S., & Rathod, V. K. (2016a). Magnetic macromolecular cross linked enzyme aggregates (CLEAs) of glucoamylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 83, 78–87.

Nadar, S. S., & Rathod, V. K. (2016b). Sonochemical effect on activity and conformation of commercial lipases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1–19.

Nadar, S. S., & Rathod, V. K. (2017a). Facile synthesis of glucoamylase embedded metalorganic frameworks (glucoamylase-MOF) with enhanced stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 511–519.

Nagendran, R., 2011. Chapter 24 - Agricultural Waste and Pollution, *Waste A Handbook for Management*, pp. 341–355.

Nakthong, N., Wongsagonsup, R., Amornsakchai, T., 2017. Characteristics and potential utilizations of starch from pineapple stem waste. *Ind. Crop. Prod.* 105, 74–82.

Nammakuna, N., Barringer, B. A., & Ratanatriwong, P. (2015). The effects of protein isolates and hydrocolloids complexes on dough rheology, physicochemical properties and qualities of gluten-free crackers. *Food Sciences and Nutrition*, 4(2), 143–155.

Nasri, R., Abdelhedi, O., Jemil, I., Daoued, I., Hamden, K., Kallel, C., et al. (2015). Ameliorating effects of goby fish protein hydrolysates on high-fat-high-fructose diet induced hyperglycemia, oxidative stress and deterioration of kidney function in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 242, 71–80.



Nastaj, M., Sołowiej, B. G., Terpiłowski, K., & Mleko, S. (2020). Effect of erythritol on physicochemical properties of reformulated high protein meringues obtained from whey protein isolate. *International Dairy Journal*, 105. Article 104672.

Ngoh, Y. Y., & Gan, C. Y. (2016). Enzyme assisted extraction and identification of antioxidative and  $\alpha$ -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). *Food Chemistry*, 190, 331–337.

Nguyen Thai Huynh, G. S. (2014). Enzyme-Assisted Extraction Enhancing the Phenolic Release from Cauliflower (*Brassica oleracea* L. var *botrytis*) outer leaves. *journal of agricultural and food chemistry*, 7468–7476.

Nicole, T. Z. H., Nichelle, T. S., Elizabeth, T. E., & Yuliarti, O. (2021). Formulation of functional crackers enriched with fermented soybean (tempeh) paste: Rheological and microstructural properties. *Future Foods*, 4. Article 100050.

Nilnakara, S.; Chiewchan, N.; Devahastin, S., Production of antioxidant dietary fibre powder from cabbage outer leaves, *Food Bioprod. Process.* 87(2009) 301-307 of alfalfa soluble leaf proteins. *LWT-Food Sci Technol* 40:1520–1526.

Niranjan, K., Hanmoungjai, P., 2004. Enzyme-aided aqueous extraction. In: Dunford, N.T., Dunford, H.B. (Eds.), *Nutritionally Enhanced Edible Oil Processing*. AOCS Press. ebook, Champaign, Illinois, ISBN 978-1-4398-2227-2.

Nirmala, C., Bisht, S. M., Bajwa, K. H., Santosh, O. (2018). Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry. *Trends in Food Science & Technology*, 77, 91-99.

Nouman, Wasif, Anwar, Farooq, Gull, Tehseen, Newton, Amaglo, Rosa, Eduardo, & Domínguez-Perles, Raúl (2016). Profiling of polyphenolics, nutrients and antioxidant potential of germplasm's leaves from seven cultivars of *Moringa oleifera* Lam. *Industrial Crops and Products*, 83, 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.032>.

Oakenfull, D., Pearce, J., & Burley, R. W. (1997). Protein gelation. In S. Damodaran & A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their applications* (pp. 111–141). New York: Marcel Dekker.

Ochoa-Rivas, A., Nava-Valdez, Y., Serna-Saldívar, S. O., & Chuck-Hernández, C. (2017). Microwave and ultrasound to enhance protein extraction from peanut flour under alkaline conditions: Effects in yield and functional properties of protein isolates. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 543-555.

Okonko, I.O., Adeola, O.T., Aloysius, F.E., Damilola, A.O., Adewale, O.A., 2009. Utilization of food wastes for sustainable development. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* 8, 263–286.

Okuno, S., Yoshinaga, M., Nakatani, M., Ishiguro, K., Yoshimoto, M., Morishita, T., Uehara, T., Kawano, M., 2002. Extraction of antioxidants in sweet potato waste powder with supercritical carbon dioxide. *Food Sci. Technol.* 8, 154–157.

Omura, M. H., Oliveira, A. P. H. D., Soares, L. D. S., Coimbra, J. S. D. R., Barros, F. A. R. D., Vidigal, M. C. T. R., Pereira, M. C. B., & Oliveira, E. B. D. (2021). Effects of protein concentration during ultrasonic processing on physicochemical properties and techno-functionality of plant food protein. *Food Hydrocolloids*, 113. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106457>

Oreopoulou, V. and Tzia, C. (2007) Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants, and colorant. In V. Oreopoulou, & W. Russ (Eds.), *Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry*. Vol. 3. New York, EU, 200, 209-232.

Osborne, T.B. (1924). *The vegetable proteins*. 2nd Edn., Congmans, Green and Co., London.

Pachaiappan R, Tamboli E, Acharya A, Su C, Gopinath SCB, Chen Y, Velusamy P (2018) Separation and identification of bioactive peptides from stem of *Tinospora cordifolia* (Willd) Miers. *PLoS ONE* 13(3): 0193717

Padovan, L., Scocchi, M., and Tossi, A. (2010): Structural aspects of plant antimicrobial  
Panouille, M., Ralet, M.C., Bonnin, E., Thibault, J.F., 2007. Recovery and reuse of trimmings and pulps from fruit and vegetable processing. In: Waldron, K.W. (Ed.), *Handbook of*

Waste Management and Co-product Recovery in Food Processing. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 417–47.

Patel, P. D., Stripp, A. M., & Fry, J. C. (1988). Whipping test for the determination of foaming capacity of protein: a collaborative study. *International Journal of Food Science and Technology*, 23(1), 57–63.

Patrathip Rodsamran, Rungsinee Sothornvit (2018) Physicochemical and functional properties of protein concentrate from byproduct of coconut processing. *Food chem* 241:364-371. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.08.116>

Paulson, A. T., & Tung, M. A. (1989). Thermally induced gelation of succinylated canola protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(2), 319–326.

Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 716–723.

Peričin D. i Radulović, Lj. (2006). Proteini i njihova ekstrakcija iz semena i pogače uljane tikve golice c.c «Olinka», 47. savetovanje Proizvodnja i prerada uljarica, Zbornik radova (169- 174), Herceg Novi, 2006.

Pernell C, Foegeding E, Luck P, Davis J (2002) Properties of whey and egg white protein foams. *Colloids Surf. A Physicochem Eng. Asp* 204:9–21. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)01061-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)01061-5)

Peterson, M. E., Daniel, R. M., Danson, M. J., & Eienthal, R. (2007). The dependence of enzyme activity on temperature: Determination and validation of parameters. *Biochemical Journal*, 402(2), 331–337.

Pirayesh, H., Khazaeian, A., Tabarsa, T., 2012. The potential for using walnut (*Juglans regia* L.) shell as a raw material for wood-based particleboard manufacturing. *Compos. B Eng.* 43, 3276–3280.

Pirie, N.W. (1971). Leaf protein: its agronomy, preparation, quality and use. (Pirie, N.W. Ed.), IBP Handbook No.20, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh.

Pirie, N.W. (1978). Leaf protein and other aspects of fodder fractionation, Cambridge University Press, London.

Pirie, N.W. (1987) Leaf protein and its by-products in human and animal nutrition. Cambridge University Press, London.

Pojic, M., Misan, A., & Tiwari, B. (2018). Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. Trends in Food Science and Technology, 75, 93-104.

Popović L, Peričin D, Vaštag Ž, Popović S, Krimer V, Torbica A (2013) Antioxidative and Functional Properties of Pumpkin Oil Cake Globulin Hydrolysates. J Am Oil Chem Soc 90:1157-1165. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2257-5>

Popović, Lj., Stolić, Ž., Čakarević, J., Torbica, J., Tomić, J., Šijački, M. (2017). Biologically active digests from pumpkin oil cake protein: effect of cross-linking by transglutaminase. Journal of the American oil chemists' society, 94, 1245-1251.

Pravilnik o prehrambenim i zdravstvenim izjavama koje se navode na deklaraciji hrane („Sl.glasnik RS“, br. 51/2018 i 103/2018)<https://www.tehnologijahrane.com/pravilnik/pravilnik-o-prehrambenim-i-zdravstvenim-izjavama-koje-se-navode-na-deklaraciji-hrane>

Prévot-D'Alvise, N.; Lesueur-Lambert, C.; Fertin-Bazus, A.; Fertin, B.; Dhulster, P. (2003) Development of a pilot process for the production of alfalfa peptide isolate. J. Chem. Technol. Biotechnol., 78 (5), 518-528.

Prévot-D'Alvise, N.; Lesueur-Lambert, C.; Fertin-Bazus, A.; Fertin, B.; Dhulster, P.; Guillochon, D. (2004) Continuous enzymatic solubilization of alfalfa proteins in an ultrafiltration reactor 11. Enzyme and Microbial Technology, 34 (5), 380-391.

properties of protein concentrate of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – an edible seaweed.

Puppo, M. C., Speroni, F., Chapleau, N., Lamballerie, M., An˜o'n, M. C., & Anton, M. (2005). Effect of high-pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins. Food Hydrocolloids, 19, 289–296.

Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 37–44.

Qadri, T., Hussain, S. Z., Rather, A. H., Amin, T., & Naseer, B. (2018). Nutritional and storage stability of wheat-based crackers incorporated with brown rice flour and carboxymethyl cellulose (CMC). *International Journal of Food Properties*, 21, 1117e1128.

Qian, J., Li, Y., Gao, J., He, Z., & Yi, S. (2020). The effects of ultrasonic intensity on physicochemical properties of Chinese fir. *Ultrasonic Sonochemistry*, 64, 104985. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.104985>

Radočaj, O., Dimić, E., & Tsao, R. (2014). Effects of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil press-cake and decaffeinated green tea leaves (*Camellia sinensis*) on functional characteristics of gluten-free crackers. *Journal of Food Science*, 79(3), C318–C325. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12370>.

Rahman, M. M., Byanju, B., Grewell, D., & Buddhi, P. L. (2020). High-power sonication of soy proteins: Hydroxyl radicals and their effects on protein structure. *Ultrasonics Sonochemistry*, 64, 105019. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105019>

Ralet, M.C., Bonnin, E., Thibault, J.F., 2005. In: Steinbuchel, A., Ki Rhee, S. (Eds.), *Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry: Properties, Production, and Patents*, vol. 1. Wiley- VCH, Weinheim, pp. 351–386, 10.

Ramachandran, S., Singh, S. K., Larroche, C., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2007). Oil cakes and their biotechnological applications e a review. *Bioresource Technology*, 98, 2000-2009.

Rault, M.; Giudiciorticoni, M. T.; Gontero, B.; Ricard, J. (1993) Structural and Functional-Properties of A Multienzyme Complex from SpinachChloroplasts .1. Stoichiometry of the Polypeptide-Chains. *European Journal of Biochemistry*, 217 (3), 1065-1073.

Raymundo, A., Franco, J., Gallegos, C., Empis, J., & Sousa, I. (1998). Effect of thermal denaturation of lupin protein on its emulsifying properties. *Nahrung*, 42(3–4), 220–224.

Re R., Pellegrini N, Proteggente A, et al (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

rezultati

Righetti P. G., and Boschetti, E., (2016): Global proteome analysis in plants by means of peptide libraries and applications. *Journal of Proteomics*, 143, 3–14.

Rita Ru En Tay, Talia Agatha, Gweon Somang, Oni Yuliarti\* , Eunice Li Lin Tan Structuring wheat flour-based crackers using whey protein isolate *International Dairy Journal* 128 (2022) 105314

Roesch, R. R., & Corregio, M. (2003). Texture and microstructure of emulsions prepared with soy protein concentrate by high-pressure homogenization. *Lebensmittel-Wissenschaft-Und Technologie*, 36, 113–124.

Rosario Goyenechea, Karina Di Scalaa, Cristina L. Ramirez, María A. Fanovichc, 2020. Recovery of bioactive compounds from beetroot leaves by supercritical CO<sub>2</sub> extraction as a promising bioresource. *J. of Supercritical Fluids* 155, 104658.

Rosset, M., Acquaro Junior, V. R., & Bel'eia, A. D. P. (2014). Protein Extraction from Defatted Soybean Flour with Viscozyme L Pretreatment. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(3), 784-790.

Różyło, R., Wójcik, M., Dziki, D., Biernacka, B., Cacak-Pietrzak, G., Gawłowski, S., Zdybel,

Rudra, S.G., Nishad, J., Jakhar, N., Kaur, C., 2015. Food industry waste: mine of nutraceuticals. *Int. J. Sci. Environ. Technol.* 4, 205–229.

Sa', A. G. A., Moreno, Y. M. F., & Carciofi, B. A. M. (2020). Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. *Trends in Food Science and Technology*, 97, 170- 184.

Sadh, P.K., Duhan, S., Duhan, J.S., 2018. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresour. Bioprocess.* 5, 1–15.

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014c). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>.

Sagar, N.A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E.M., Lobo, M.G., 2018. Fruit and vegetable waste: bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. *CRFSFS* 17, 512–531.

Saha J, Deka SC (2017) Functional properties of sonicated and nonsonicated extracted leaf protein concentrate from *Diplazium esculentum*. *Int J Food Prop* 20(5):1051–1061. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1199034>

Sainvitu, P., Nott, K., Richard, G., Blecker, C., Jerome, C., Wathelet, J.P., Paquot, M., Deleu, M., 2012. Structure, properties and obtention routes of flaxseed lignan secoisolariciresinol: a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16, 115.

Samuel, A.U., Oyawale, F., Fayomi, O.S.I., 2019. Effects of waste management in beverage industries: a perspective. *J. Phys.: Conf. Ser.* 1378, 022048.

Sandhu, K.S., Lim, S.T., 2008. Structural characteristics and in vitro digestibility of Mango kernel starches (*Mangifera indica* L.). *Food Chem.* 107, 92–97.

Sari, Y. W., Bruins, M. E., & Sanders, J. P. M. (2013). Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. *Industrial Crops and Products*, 43, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.014>.

Sarkar, A., & Kaul, P. (2014). Evaluation of tomato processing by-products: A comparative study in a pilot scale setup. *Journal of Food Process Engineering*, 37, 299-307.

Sathe, S. K. (2002). Dry bean protein functionality. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(2), 175–223.

Schieber, A., Hilt, P., Streker, P., Endreß, H.U., Rentschler, C., Carle, R., 2003. A new process of the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple waste. *Innov. Food sci. Emerg.* 4, 99–107.

Schwenke, K. D., Zirwer, D., Gast, K., Gornitz, E., Linow, K., & Gueguen, J. (1990). Changes of the oligomeric structure of legumin from pea (*Pisum sativum* L) after succinylation. *European Journal of Biochemistry*, 194, 621–627.

Secundo, F. Guerrieri, N. (2005). ATR-FT/IR study on the interactions between gliadins and dextrin and their effects on protein secondary structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1757–1764.

Shamraja S. Nadar, Priyanka Rao, Virendra K. Rathod, 2018, Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review *Food Research International* 108, Pages 309-330 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.006>

Sharanappa, A., Wani, K.S., Pallavi, P., 2011. Bioprocessing of food industrial waste for  $\alpha$ -amylase production by solid state fermentation. *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.* 2, 473–480.

Sheen, S. J. (1991) Comparison of Chemical and Functional-Properties of Soluble Leaf Proteins from 4 Plant-Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39 (4), 681-685.

Sheen, V. L. (1985) Functional-Properties of Fraction-1 Protein from Tobacco Leaf. sheets. *International Agrophysics*, 33, 217-225.

Shehzad, A., Ahmad, N., Hussain, Z., Haider, M.S., Rashid, N., 2018. Valorization of waste foods using pullulan hydrolase from *Thermococcus kodakarensis*. *Amylase* 2, 39–43.

Shi, A., Feng, X., Wang, Q., & Adhikari, B. (2020). Pickering and high internal phase pickering emulsions stabilized by protein-based particles: A review of synthesis, application and prospective. *Food Hydrocolloids*, Article 106117.

Shilpi, A.; S, S. U.; S, B., Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of Compounds with Antioxidant Activity from Fruits and Vegetables Waste -A Review, *Fmfi*. 2(2013) 43-62.

Shima Momen, Farhad Alav, Mohammed Aider (2021) Alkali-mediated treatments for extraction and functional modification of proteins: Critical and application review. *Trends in Food Science & Technology*, [110](#), April 2021, Pages 778-797



Shimada, K., and Matsushita, S. (1980). Relationship between thermocoagulation of proteins and amino acid compositions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(2), 13–17.

Silva, L.V., Nelson, D.L., Drummond, M.F.B., Dufosse, L., Gloria, M.B.A., 2005. Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. *Food Res. Intl.* 38, 1087–1096.

Silva, P. C. da, Toledo, T., Brião, V., Bertolin, T. E., & Costa, J. A. V. (2021). Development of extruded snacks enriched by bioactive peptides from microalga *Spirulina* sp. LEB 18. *Food Bioscience*, 42, 101031. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101031>

Silveira, T.M.G., Blacido, D.R.T., 2018. Is isolating starch from the residue of annatto pigment extraction feasible? *Food Hydrocolloids* 77, 117–125.

Sindiri, M.K., Machavarapu, M., Vangalapati, M., 2013. Alfa-amylase production and purification using fermented orange peel in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. *Indian J. Appl. Res.* 3, 49–51.

Singh, P., Singh, R., Jha, A., Rasane, P., & Gautam, A. K. (2015). Optimization of a process for high fibre and high protein biscuit. *Journal of Food Science & Technology*, 52, 1394e1403.

Singh, R., Geetanjali, 2013. Nutraceuticals: promising health product. *Int. J. Res. Med. Sci.* 1 (1), 14–17.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Wilchek M, Bayer EA (eds) *Methods in enzymology*, 299, 152-178.

Sloan, A. E. (2019). Top 10 food trends. *Food Technology*, 73(4), 30–47. <https://doi.org/10.4236/aasoci.2012.23026>

Someya, S., Yoshiki, Y., Okubo, K., 2002. Antioxidant compounds from bananas (*Musa cavendish*). *Food Chem.* 79, 351–354.

Sousa R, Portmann R, Dubois S, Recio I, Egger L (2020) Protein digestion of different protein sources using the INFOGEST static digestion model. *Food Res Int* 130:108996. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108996>

Sousa, I. M. N., Morgan, P. J., Mitchell, J. R., Harding, S. E., & Hill, S. E. (1996). Hydrodynamic characterization of lupin proteins: Solubility, intrinsic viscosity, and molar mass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3018–3021.

Sowbhagya, H. B., Purnima, K. T., Florence, S. P., Appu Rao, A. G., & Srinivas, P. (2009). Evaluation of enzyme assisted extraction on quality of garlic volatile oil. *Food Chemistry*, 113(4), 1234–1238.

Soxhlet, F., 1879. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Dingler's Polytech J.* 232, 461–465.

Sritoth, K., Chollakup, R., Chotineeranat, S., Piyachomkwan, K., Oates, C.G., 2000. Processing of cassava waste for improved biomass utilization. *Bioresour. Technol.* 71, 63–69.

Stevenson, D.G., Domoto, P.A., Jane, J.L., 2006. Structures and functional properties of apple (*Malus domestica* Borkh) fruit starch. *Carbohydr. Polym.* 63, 432–441.

Sukan, A., Roy, I., Keshavarz, T., 2014. Agro-industrial waste materials as substrates for the production of poly(3-hydroxybutyric acid). *J. Biomaterials Nanobiotechnol.* 5, 229–240.

Suresh Kumar K, Ganesan K, Selvaraj K, Subba Rao PV (2014) Studies on the functional

Suresh Kumar K, Ganesan K, Selvaraj K, Subba Rao PV (2014) Studies on the functional properties of protein concentrate of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – an edible seaweed. *Food Chem* 153:353–360.

T.Bn. Brito, A. P. (2020). Chemical composition and physicochemical characterization for cabbage and pineapple by-products flour valorization. *LWT - Food Science and Technology* 124.

Talley, K., & Alexov, E. (2010). On the pH-optimum of activity and stability of proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(12), 2699–2706.

Tamayo Tenorio A, Gieteling J, Govardus AH de Jong et al (2016) Recovery of protein from green leaves: overview of crucial steps for utilisation. *Food Chem* 203:402–408. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.02.092>

Tamayo Tenorio, A., Gieteling, J., de Jong, G. A. H., Boom, R. M., & van der Goot, A. J. (2016). Recovery of protein from green leaves: Overview of crucial steps for utilisation. *Food Chemistry*, 203, 402–408. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.092>.

Tamayo Tenorio, A., Gieteling, J., de Jong, G. A. H., Boom, R. M., & van der Goot, A. J. (2016). Recovery of protein from green leaves: Overview of crucial steps for utilisation. *Food Chemistry*, 203, 402–408. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.092>.

Tamayo Tenorio, A., Gieteling, J., Nikiforidis, C. V., Boom, R. M., & van der Goot, A. J. (2017c). Interfacial properties of green leaf cellulosic particles. *Food Hydrocolloids*, 71, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.030>.

Tang, S. Q., Du, Q. H., & Fu, Z. (2021a). Ultrasonic treatment on physicochemical properties of water-soluble protein from *Moringa oleifera* seed. *Ultrasonic Sonochemistry*, 71, 105357. <https://doi.org/10.1016/2Fj.ultsonch.2020.105357>

Taniya, M. S., Reshma, M. V., Shanimol, P. S., Krishnan, G., & Priya, S. (2020). Bioactive peptides from amaranth seed protein hydrolysates induced apoptosis and antimigratory effects in breast cancer cells. *Food Bioscience*, 100588.

Tanongkankit, Y.; Chiewchan, N.; Devahastin, S., Physicochemical property changes of cabbage outer leaves upon preparation into functional dietary fiber powder, *Food Bioprod. Process.* 90(2012) 541-548.

Tassadit Benhammouche, Armindo Melo, Zita Martins, Miguel A. Faria, Susana C. M. Pinho, Isabel M.L.P.V.O. Ferreira, Farid Zaidi (2021) Nutritional quality of protein concentrates from *Moringa Oleifera* leaves and in vitro digestibility *Food Chemistry*, 348, 128858 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128858>

Teixeira, Estelamar Maria Borges, Carvalho, Maria Regina Barbieri, Neves, Valdir Augusto, Silva, Maraíza Apareci, & Arantes-Pereira, Lucas (2014). Chemical characteristics and

fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Food Chemistry*, 147, 51–54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.135>

Tenorio AT, Schreuders FKG, Zisopoulos FK, Boom RM, van der Goot AJ (2017) Processing concepts for the use of green leaves as raw materials for the food industry. *J Clean Product* 164:736–748.

Tibbetts, S. M., Milley, J. E., & Lall, S. P. (2015). Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 27(3), 1109–1119. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-014-0428-x.7>

Timilsena, Y. P., Adhikari, R., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2016). Microencapsulation of chia seed oil using chia seed protein isolate chia seed gum complex coacervates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 347–357. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.05.058>

Tomičić, Z. M., Spasevski, N. J., Popović, S. J., Banjac, V. V., Đuragić, O. M., Tomičić, R. M. (2020). By- products of the oil industry as sources of amino acids in feed. *Food and Feed Research*, 47 (2), 131-137.

Tonolo, F., Folda, A., Cesaro, L., Scalcon, V., Marin, O., Ferro, S., et al. (2020). Milk-derived bioactive peptides exhibit antioxidant activity through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Journal of Functional Foods*, 64, 103696.

Topakas, E., Kalogeris, E., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P., 2004. Production of phenolics from corn cobs by coupling enzymic treatment and solid-state fermentation. *Eng. Life Sci.* 4, 283–286.

Torres, J.L., Bobet, R., 2001. New flavanol derivatives from grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant aminoethylthio-flavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of flavanols. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4627–4634.

Torres, M.D., Fradinho, P., Rodriguez, P., Falque, E., Santos, V., Dominguez, H., 2020. Biorefinery concept for discarded potatoes: recovery of starch and bioactive compounds. *J. Food Eng.* 275, 109886.

Tsaliki, E., Pegiadou, S., & Doxastakis, G. (2004). Evaluation of the emulsifying properties of cottonseed protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 18(4), 631–637.

Tsikritzi, R., Moynihan, P. J., Gosney, M. A., Allen, V. J., & Methven, L. (2014). The effect of macro- and micro-nutrient fortification of biscuits on their sensory properties and on hedonic liking of older people. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 2040e2048.

USDA (2016a). Seaweed, spirulina, raw national nutrient database for standard reference.

Uzunalic, A.P., Skerget, M., Knez, Z., 22–26 August 2004. Isolation of active ingredients from green tea (fanning bellas, China). In: *Proceedings of the 16th International Congress of Chemical and Process Engineering-CHISA, Prague, Czech Republic*.

Valencia, M.R., Perez, G.P., Magana, S.G.C., Quintero, G.C.C., Garcia, A.Y.N., Dumont, M.J., Urbina, K.P., 2020. Utilization of Mango Wastes as a Potential Feedstock for the Production of HMF. *Biomass Conv. Bioref.* <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01070-9>.

Valle, M.D., Camara, M., Torija, M.E., 2006. Chemical characterization of tomato pomace. *J. Sci. Food Agric.* 86, 1232–1236.

van de Velde F; Alting, A.; Pouvreau, L.(2011) From wasteproduct to food ingredient: the extraction of the abundant plant protein Rubisco. *New Food*, pp 10-14.

van Krimpen, M. M., Bikker, P., van der Meer, I. M., van der Peet-Schwering, C. M. C., & Vereijken, J. M. (2013). Cultivation, processing and nutritional aspects for pigs and poultry of European protein sources as alternatives for imported soybean products. Wageningen, The Netherlands: Wageningen UR Livestock Research.

van Vliet, T., Martin, A. H., & Bos, M. A. (2002). Gelation and interfacial behaviour of vegetable proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(5–6), 462–468.

Vani, B. & Zayas, J. F. (1995) Foaming properties of selected plant and animal proteins. *Journal of food science*, 60, 1025-1028

Vaštag Z, Popović L, Popović S, Peričin-Starcević I, Krimer Malesević V (2013) In vitro study on digestion of pumpkin oil cake protein hydrolysate: evaluation of impact on bioactive properties. *Int J Food Sci Nut* 64:452–460. <https://doi.org/10.3109/09637486.2012.749837>

Volpi, E., Kobayashi, H., Sheffield-Moore, M., Mittendorfer, B., & Wolfe, R. R. (2003). Essential amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78(2), 250–258.

Vorobiev, E., Lebovka, N.I., 2006. Extraction of intercellular components by pulsed electric fields. In: Raso, J., Heinz, V. (Eds.), *Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry*. Springer, New York, N.Y., pp. 153–193

Wadhwa, M.; Bakshi, M. P. S. (2013). Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products.

Waldron, K., 2009. *Handbook of Waste Management and Co-product Recovery in Food Processing*. Woodhead Publishing, Cambridge, UK.

Walstra, P. (1988). The role of protein in stabilization of emulsions. In G. O. Phillips, D. J. Wedlock, & P. A. Williams (Eds.), *Gums and Stabilizers for the Food Industry 4* (pp. 323–336). Oxford: IRL Press

Wang JC and Kinsella JE, (1976) Functional properties of novel proteins: Alfalfa leaf protein. *J Food Sci* 41:286–292.

Wang, H.Y., Liu, S., Zhai, L.M., Zhang, J.Z., Ren, T.Z., Fan, B.Q., Liu, H.B., 2015a. Preparation and utilization of phosphate biofertilizers using agricultural waste. *J. Integr. Agric.* 14, 158–167.

Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Li, X., 2008. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem.* 106, 804–810.

Wang, S.R., Ru, B., Dai, G.X., Sun, W.X., Qiu, K.Z., Zhou, J.S., 2015b. Pyrolysis mechanism study of minimally damaged hemicellulose polymers isolated from agricultural waste straw samples. *Bioresour. Technol.* 190, 211–218.

Wang, X., Chen, Q., Lu, X., 2014. Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids* 38, 129–137.

WHO/FAO/UNU Expert Consultation (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. *World Health Organization Technical Report Series*, 935, 1–265.

Wierenga, P. A., Egmond, M. R., Voragen, A. G. J. and de Jongh, H. H. J. (2006) The adsorption and unfolding kinetics determines the folding state of proteins at the air–water interface and thereby the equation of state. *Journal of colloid and interface science*, 299, 850-857.

Wijesinghe, W. A. J. P., & Jeon, Y. J. (2012). Enzyme-assistant extraction (EAE) of bioactive components: A useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: A review. *Fitoterapia*, 83(1), 6–12.

Wilde, P. J. (2000) Interfaces: their role in foam and emulsion behaviour. *Current opinion in colloid & interface science*, 5, 176-181.

Wong, K. H., & Cheung, P. C. K. (2001). Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds Part II. In vitro protein digestibility and amino acid profiles of protein concentrates. *Food Chemistry*, 72(1), 11–17. [http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146\(00\)00176-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146(00)00176-x).

Wu, J., Liao, W., & Udenigwe, C. C. (2017). Revisiting the mechanisms of ACE inhibitory peptides from food proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 214–219. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.07.011>

Yang X, Yuting L, Tao B, Xiaodong Z, Wei C, Jianxu W (2017) A recyclable protein resource derived from cauliflower by-products: potential biological activities of protein hydrolysates. *Food Chem* 221:114–122.

Yang Xu, Yuting Li, Tao Bao, Xiaodong Zheng, Wei Chen, Jianxu Wang (2017) A recyclable protein resource derived from cauliflower by-products: Potential biological activities of protein hydrolysates. *Food chem* 221:114-122. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.10.053>

Yano, Y. F., Uruga, T., Tanida, H., Toyokawa, H., Terada, Y., Takagaki, M. and Yamada, H. (2008). Driving force behind adsorption-induced protein unfolding: a time-resolved x-ray reflectivity study on lysozyme adsorbed at an air/water interface. *Langmuir*, 25, 32-35.

Yoshie-Stark, Y., Wada Y., & Wäsche (2008): Chemical composition, functional properties, and bioactivities of rapeseed protein isolates. *Food Chemistry* 107, 32-39.

Yu, X., Bogaert, L., Hu, R., Bals, O., Grimi, N., & Vorobiev, E. (2016). A combined coagulation-ultrafiltration method for enhanced separation of proteins and polyphenols. *Separation Science and Technology*, 51, 1030–1041.

Zafar, T.A., Sidhu, J.S., 2017. Composition and nutritional properties of mangoes. *Handbook of mango fruit: production. Postharvest Science, Processing Technology and Nutrition* 217.

Zavala, J.A., Dominguez, C.R., Vega, V.V., Aguilar, G.G., 2010b. Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut fruits using their own by products: looking for integral exploitation. *J. Food Sci.* 75, 175–181.

Zavala, J.F.A., Dominguez, C.R., Vega, V.V., Aguilar, G.A.G., 2010a. Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut fruits using their own byproducts: looking for integral exploitation. *J. Food Sci.* 75, 175–181.

Zayas, J. F. (1997). *Functionality of food proteins*, New York, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Zenezini Chiozzi, R., Capriotti, A. L., Cavaliere, C., G. la Barbera, Piovesana, S., and A. Laganà,

Zhang, C., Sanders, J. P. M., & Bruins, M. E. (2014). Critical parameters in cost-effective alkaline extraction for high protein yield from leaves. *Biomass and Bioenergy*, 67, 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.020>.

Zhang, C., van Krimpen, M. M., Sanders, J. P. M., & Bruins, M. E. (2016). Improving yield and composition of protein concentrates from green tea residue in an agri-food supply chain: Effect of pre-treatment. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 92-101.

Zhang, S. B., Wang, Z., Xu, S. Y., & Gao, X. F. (2009). Purification and characterization of a radical scavenging peptide from rapeseed protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(10), 959–966.

Zhang, X., Zuo, Z., Yu, P., Li, T., Guang, M., & Chen, Z. (2021d). Rice peptide nanoparticle as a bifunctional food-grade pickering stabilizer prepared by ultrasonication:



Structural characteristics, antioxidant activity, and emulsifying properties. *Food Chemistry*, 343, 128545. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128545>

Zhengjun Xie, Junrong Huang, Xueming Xu, Zhengyu Jin (2008) Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry* 111, 370–376

Zhong, M., Sun, Y., Sun, Y., Fang, L., Qi, B., Xie, F., & Li, Y. (2021). Dynamic gastric stability and in vitro lipid digestion of soybean protein isolate and three storage protein-stabilized emulsions: Effects of ultrasonic treatments. *Food Research International*, 149, 110666. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110666>

Zhou, J., Chen, M., Wu, S., Liao, X., Wang, J., Wu, Q., et al. (2020). A review on mushroom-derived bioactive peptides: Preparation and biological activities. *Food Research International*, Article 109230.

Zhu Y, Zhao X, Zhang X, Liu H (2019) Extraction, structural and functional properties of *Haematococcus pluvialis* protein after pigment removal. *Int J Biol Macromol* 140:1073-1083. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.209>

Zhu Y, Zhao X, Zhang X, Liu H (2019) Extraction, structural and functional properties of *Haematococcus pluvialis* protein after pigment removal. *Int J Biol Macromol* 140:1073–1083.

Zhu, K., Zhou, H., Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical–scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41, 1296-1302.

Zhu, X., Chao, Z., Liang, Z., & Cheng, H. (2008). Amino acids production from fish proteins hydrolysis in subcritical water. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 15, 456–460.

*Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.*

### План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Нуспроизвод агроиндустрије - зелено лишће: Нови извор протеина и биоактивних једињења
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет Нови Сад б) в)
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> Докторска дисертација</p> <p>1.2 Врсте података а) <u>квантитативни</u> б) <u>квалитативни</u></p> <p>1.3. Начин прикупљања података а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту _____ г) административни подаци: навести врсту _____ д) узорци ткива: навести врсту: <u>лишће карфиола, броклија, купуса и цвекле</u></p>

ђ) снимци, фотографије: навести врсту: слике узорака у току рада

е) текст, навести врсту: литература

ж) мапа, навести врсту \_\_\_\_\_

з) остало: описати: експериментални резултати

### 1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

#### 1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека .xlsx

б) SPSS фајл, датотека \_\_\_\_\_

с) PDF фајл, датотека .pdf

д) Текст фајл, датотека .docx

е) JPG фајл, датотека .jpeg

ф) Остало, датотека \_\_\_\_\_

#### 1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли \_\_\_\_\_

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) \_\_\_\_\_

#### 1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) \_\_\_\_\_ временски размак између поновљених мера је од неколико минута до неколико дана

б) \_\_\_\_\_ варијабле које се више пута мере односе се на сва експериментална мерења

в) \_\_\_\_\_ нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као \_\_\_\_\_

Напомене: \_\_\_\_\_

*Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?*

*а) Да*

*б) Не*

*Ако је одговор не, образложити \_\_\_\_\_*

\_\_\_\_\_

## 2. Прикупљање података

### 2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

#### 2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип: ензимска хидролиза протеинских супстрата, екстракција

лишћа, испитивање физичких, морфолошких и биолошких особина узорака

б) корелационо истраживање, навести тип \_\_\_\_\_

ц) анализа текста, навести тип : прикупљање литературних података и упоређивање са експерименталним подацима

д) остало, навести шта \_\_\_\_\_

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

## 2.2 Квалитет података и стандарди

### 2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? \_\_\_\_\_

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

### 2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан понављањем експерименталних мерења.

### 2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података је контролисана њиховим упоређивањем са експерименталним и литературним подацима.

## 3. Третман података и пратећа документација

### 3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у НаРДУс – Националном репозиторијуму дисертација у Србији и у репозиторијуму Информационог система научне делатности Универзитета у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса <https://nardus.mpn.gov.rs/>,  
<http://www.uns.ac.rs/index.php/univerzitet/javnost-rada-2/javni-uid-doktorske>

3.1.3. DOI

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до \_\_\_\_\_

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог \_\_\_\_\_

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.  
Образложење

---

---

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен?

---

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

---

---

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

---

---

---

---

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму?

---

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да Не

Образложити

---

---

#### 4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

#### 4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности

([https://www.paragraf.rs/propisi/zakon\\_o\\_zastiti\\_podataka\\_o\\_licnosti.html](https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html)) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

---

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
  - б) Подаци су анонимизирани
  - ц) Остало, навести шта
- 
- 

### 5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

*а) јавно доступни*

*б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области*

*ц) затворени*

*Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:*

---

---

*Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:*

---

---

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

---

### 6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Tea Sedlar, tea88todorovic@gmail.com

*6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима*

Tea Sedlar, tea88todorovic@gmail.com

*6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима*

*Tea Sedlar, tea88todorovic@gmail.com*