

Svojstva kakaove ljuske i proteina boba tretiranih visokonaponskim električnim pražnjenjem

Smiljanić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:011878>

Rights / Prava: [Attribution-ShareAlike 4.0 International / Imenovanje-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-07**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Marija Smiljanić

**SVOJSTVA KAKAOVE LJUSKE I PROTEINA BOBA
TRETIRANIH VISOKONAPONSKIM ELEKTRIČNIM
PRAŽNJENJEM**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Sveučilišni diplomski studij Prehrambeno inženjerstvo

Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za tehnologiju ugljikohidrata
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: **Biotehničke znanosti**
Znanstveno polje: **Prehrambena tehnologija**
Tema rada **prihvaćena je na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2023./2024. održanoj 28. lipnja 2024.**
Mentor: **prof. dr. sc. Đurđica Ačkar**
Pomoć pri izradi: **dr. sc. Veronika Barišić**

SVOJSTVA KAKAOVE LJUSKE I PROTEINA BOBA TRETIRANIH VISOKONAPONSKIM ELEKTRIČNIM PRAŽNENJEM **Marija Smiljanić, 0113148731**

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je usporediti netretirane uzorke proteina boba i kakaove ljuske s uzorcima tretiranim u uređaju za visokonaponsko električno pražnjenje (HVED). Tretiranje uzoraka provedeno je na različitim frekvencijama (20 Hz, 40 Hz, 60 Hz i 80 Hz) i tijekom različitih vremena (30 sekundi, 1, 5, 10 i 20 minuta). Metode koje su korištene za usporedbu uzoraka su: električna vodljivost, boja, kapacitet vezanja ulja, određivanje ukupnih fenola (za kakaovu ljusku), određivanje svojstva pjenjenja i svojstva emulzije (za proteine).

Utvrđeno je da tretmani HVED-om ne utječu značajno na električnu vodljivost niti kod proteina boba niti kod kakaove ljuske. Također, tretmani ne utječu značajno na ukupnu promjenu boje, ali ističu se tretmani za kakaovu ljusku na 20 Hz tijekom 20 minuta te za proteine boba na 60 Hz tijekom 1 minute te na 40 Hz tijekom 30 sekundi koji su pokazali veću ukupnu promjenu boje. Tretmani HVED-om smanjuju sadržaj ukupnih fenola u kakaovoj ljusci (izuzetak tretmani na 60 Hz tijekom 1 minute i 5 minuta), smanjuju sposobnost pjenjenja proteina boba i smanjuju indeks emulgirajuće aktivnosti. Tretmani HVED-om kod kakaove ljuske povećavaju kapacitet vezanja ulja, dok je kod proteina boba smanjuju.

Ključne riječi: kakaova ljuska, proteini, bob, HVED

Rad sadrži: 42 stranice
13 slika
4 tablice
0 priloga
50 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1.	prof. dr. sc. Jurislav Babić	predsjednik
2.	prof. dr. sc. Đurđica Ačkar	član-mentor
3.	izv. prof. dr. sc. Antun Jozinović	član
4.	prof. dr. sc. Drago Šubarić	zamjena člana

Datum obrane: 27. rujna 2024.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
University Graduate Study Food Engineering

Department of Food Technologies
Subdepartment of Carbohydrates Technology
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Thesis subject: was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX. held on June 28th 2024.
Mentor: Đurdica Ačkar, PhD, prof.
Technical assistance: Veronika Barišić, PhD

PROPERTIES OF COCOA BEAN SHELL AND BROAD BEAN PROTEIN TREATED WITH HIGH VOLTAGE ELECTRICAL DISCHARGE

Marija Smiljanić, 0113148731

Summary: The aim of this research was to compare untreated broad bean protein and cocoa shell samples with ones treated by a high-voltage electrical discharge device (HVED). The samples were treated at different frequencies (20 Hz, 40 Hz, 60 Hz and 80 Hz) and for different times (30 seconds, 1, 5, 10 and 20 minutes). The methods used to compare samples were: electrical conductivity, color, oil binding capacity, determination of total phenols (for cocoa shell), determination of foaming properties and emulsion properties (for proteins). It was found that HVED treatments did not significantly affect the electrical conductivity of either the broad bean protein or the cocoa shell. Also, the treatments do not significantly affect the total color change, although the treatments for the cocoa shell at 20 Hz for 20 minutes and for the broad bean proteins at 60 Hz for 1 minute, and at 40 Hz for 30 seconds stand out, showing a greater overall color change. Treatments by HVED reduce the content of total phenols in the cocoa shell (exception are treatments at 60 Hz for 1 minute and 5 minutes), reduce the foaming ability of the broad bean protein and reduce the index of emulsifying activity. Treatments with HVED in cocoa husks increase the oil binding capacity, while in bean protein they decrease it.

Key words: cocoa shell, protein, faba bean, HVED

Thesis contains: 42 pages
13 figures
4 tables
0 supplements
50 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | | |
|----|-----------------------------------------------|--------------|
| 1. | <i>Jurislav Babić</i> , PhD, prof. | chair person |
| 2. | <i>Đurdica Ačkar</i> , PhD, prof. | supervisor |
| 3. | <i>Antun Jozinović</i> , PhD, associate prof. | member |
| 4. | <i>Drago Šubarić</i> , PhD, prof. | stand-in |

Defense date: September 27th 2024

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

DIPLOMSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA

27. rujna 2024.

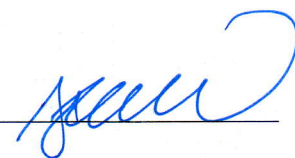
TE OCIJENJEN USPJEHOM

Vrlo dobar (4)

Pred Povjerenstvom za obranu diplomskog rada:

1. **prof. dr. sc. Jurislav Babić**

predsjednik



(potpis)

2. **prof. dr. sc. Đurđica Ačkar**

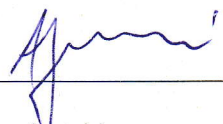
član



(potpis)

3. **izv. prof. dr. sc. Antun Jozinović**

član



(potpis)

Diplomski rad izrađen je u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost IP-2022-10-1960.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. BOB	4
2.1.1. Sastav boba.....	4
2.1.2. Skladištenje boba.....	5
2.2. PROTEINI	6
2.2.1. Sastav proteina.....	6
2.3. KAKAOVA LJUSKA	7
2.3.1. Sastav kakaove ljuske.....	8
2.3.2. Iskorištavanje kakaove ljuske.....	9
2.3.3. Problemi iskorištavanja kakaove ljuske.....	11
2.4. VISOKONAPNSKO ELEKTRIČNO PRAŽNENJE (HVED).....	12
2.4.1. Primjena HVED-a.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. ZADATAK	16
3.2. MATERIJAL I METODE	17
3.2.1. Materijali	17
3.2.2. Metode.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. ELEKTRIČNA VODLJIVOST	26
4.2. BOJA KAKAOVE LJUSKE I PROTEINA BOBA.....	28
4.3. KAPACITET VEZANJA ULJA KAKAOVE LJUSKE I PROTEINA BOBA	30
4.4. UDIO UKUPNIH FENOLA U KAKAOVOJ LJUSCI	32
4.5. SVOJSTVA PJENJENJA PROTEINA BOBA.....	33
4.6. INDEKS EMULGIRAJUĆE AKTIVNOSTI PROTEINA BOBA	34
5. ZAKLJUČCI	35
6. LITERATURA	37

1. UVOD

Cilj svake suvremene industrije je što više smanjiti količinu otpada. Kakaova ljuska predstavlja jednu od najznačajnijih vrsta otpada industrije prerade kakaovca. Iz tog razloga, da bi se što više iskoristila kakaova ljuska, provodi se sve više istraživanja. Općenito, kakaova ljuska zbog svog dobrog sastava ima puno potencijala kod komponiranja u različite proizvode. Jedna od glavnih komponenata kojima je kakaova ljuska bogata su dijetalna vlakna, ali sadrži i druge vrijedne komponente kao što su bioaktivni spojevi: teobromin, kofein, katehin, galna kiselina i epikatehin. Zbog velike količine dijetalnih vlakana kakaovu ljusku pokušava se iskoristiti za obogaćivanje hrane, osim toga koristi se kao hrana za životinje, kao sirovina za biomasu i kao sredstvo za poboljšanje kvalitete tla.

Kako raste trend potražnje proteina bilo životinjskog, bilo biljnog podrijetla, kao izvor proteina biljnog podrijetla počeo se koristiti bob. Prije je bob predstavljao hranu siromašnih, no zbog svog dobrog sastava i velike količine proteina sve se više istraživanja provodi na njemu. Općenito, proteini su važni u održavanju mišićne mase, održavanju stanične strukture i reguliranju metaboličke aktivnosti. Osim proteina, bob je dobar izvor ugljikohidrata, vitamina A, B1, B3 i minerala. Bob se smatra hranom budućih generacija zbog dobre sposobnosti fiksiranja dušika.

Ovo istraživanje provedeno je na uređaju za visokonaponsko električno pražnjenje (engl. high voltage electrical discharge, HVED) kako bi se istražile promjene koje se događaju na materijalu (proteinima boba i kakaovoj ljusci). Zbog ekološke prihvatljivosti i niske temperature tijekom tretiranja, HVED se smatra poželjnom tehnikom koja se primjenjuje za ekstrakciju polifenola, proteina, ugljikohidrata, također se koristi kao tehnika netermičkog konzerviranja i za modifikaciju tretiranog materijala. Kao cilj istraživanja provedeno je tretiranje kakaove ljuske i proteina boba na različitim frekvencijama tijekom različitih vremena. Promatrana je promjena boje, kapacitet vezanja ulja, sadržaj ukupnih fenola, svojstva pjenjenja i svojstva emulzije kod uzoraka tretiranih HVED-om u odnosu na netretirani uzorak.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BOB

Danas bob postaje sve traženiji na tržištu kao izvor proteina biljnog podrijetla jer pokazuje dobre prehrambene i funkcionalne karakteristike. Kao najveći proizvođači boba ističu se Kina, a zatim Etiopija i Ujedinjeno Kraljevstvo. Općenito, zbog porasta trenda korištenja proteina u ljudskoj prehrani, raste i potražnja za bobom kao izvorom proteina. Neka istraživanja pokazuju da bob ukoliko se konzumira u prevelikim količinama može imati i štetne posljedice na ljudsko zdravlje kao što je oštećenje jetre (Fu i sur., 2024).

Bob, poznat kao *Vicia faba* L., smatra se jednom od najstarijih biljaka koje su uzgajane te spada u jednogodišnje zimske kulture (Ismail i Ibrahim, 2023). Razlikuju se tri botaničke sorte boba s obzirom na veličinu sjemena, a to su: *Vicia faba major*, *Vicia faba var. equina* i *Vicia faba minor*. *Vicia faba var. equina* koristi se najčešće kao stočna hrana. Također, osim veličine, između sorti razlikuje se i boja boba. Boja boba može varirati od zelenkasto-bež do smeđe i ljubičaste (Pasqualone i sur., 2020).

2.1.1. Sastav boba

U nekim zemljama bob se naziva mesom za siromašne zbog količine proteina. Bob se smatra vrlo važnim usjevom zbog fiksiranja atmosferskog dušika korijenom (Almamari i Altaweel, 2023).

Općenito, zrno boba sadrži 11 % vode, 58 % ugljikohidrata, 26 % proteina i 2 % masti. U odnosu na druge mahunarke poput slanutka, graška i leće, bob sadrži najviše proteina i ugljikohidrata. Također, dobar je izvor vitamina A, B1, B3 i minerala (mangana, fosfora i željeza). Bob je jako podložan djelovanju štetnika. Bolesti koje se najčešće javljaju kod boba uzrokovane su gljivicama, a kao posljedica javlja se trulež sjemena i trulež korijena (Ismail i Ibrahim, 2023).

Bob, kao namirnica siromašna mastima, a bogata proteinima i dijetalnim vlaknima, postala je mahunarka koja je druga po popularnosti kod potrošača. Osim sjemenki boba, konzumiraju se i svježi listovi. Također, bob se koristi i kao indikator za procjenu toksičnosti tvari. Neka istraživanja pokazala su da je bob koji je uzgojen na tlu zajedno s duhanom razvio problematično gorak okus koji odbija potrošače. Uzrok gorkog okusa u hrani biljnog podrijetla su: alkaloidi, terpeni i glikozidi, a kod boba uzgojenog na tlu zajedno s duhanom nikotin (Cheng i sur., 2021).

Prema Alsawaf i Ibraheem (2023) jedna porcija od 100 grama svježeg boba sadrži 72,6 grama vode, 0,73 grama masti, 17,63 grama ugljikohidrata, 7,5 grama vlakana, željeza, magnezija, fosfora, kalija, vitamina C, tiamina i vitamina B te se ti brojevi mogu mijenjati ovisno o vrsti biljke i uvjetima u kojima je uzgajana.

Bob ima dobru sposobnost fiksiranja atmosferskog dušika i lako se prilagođava na okolišne uvjete pa se smatra kako bi on mogao biti hrana za buduće generacije. Bob sadrži visoke količine lizina, a siromašan je metioninom i cisteinom pa se zbog toga često kombinira sa žitaricama. U gastronomiji se bilježi porast konzumacije boba posebice na zapadu zbog porasta broja vegetarijanaca i vegana. Općenito, mahune se prodaju kao osušene i oljuštene što omogućuje skraćanje vremena kuhanja. Također, mogu se pronaći i svježi i smrznuti bob. Osim što se svježi bob može konzumirati sirov, najčešće priprema boba obuhvaća kuhanje, pirjanje, pečenje ili prženje (Pasqualone i sur., 2020).

Kod sjemena mahunarki razlikuju se dvije vrste proteina, a to su vicilin i legumin. Legumin je veći protein i čini većinu proteina sjemena boba (Bailey i Boulter, 1970).

2.1.2. Skladištenje boba

Sjemenke boba imaju visoku hranjivu vrijednost, posebice svježe mahune. Međutim, problem kod svježih mahuna je njihov kratak rok trajanja što utječe na industriju. Neka istraživanja su pokazala da na trajnost boba nakon žetve ponajviše utječu temperatura i enzimi. Na okus, boju, posmeđivanje, truljenje, omekšavanje, nutritivni sastav i rok trajanja utječe prisutnost mikroorganizama tijekom berbe, prerade i skladištenja. Kod svježeg boba prilikom skladištenja nepoželjne su niske temperature jer će uzrokovati štetu, poželjne su temperature hladnjaka od 0 do 10 °C. Temperatura od 10 °C je poželjnija zbog ekonomičnosti. Korištenje određenih konzervansa ima i prednosti i nedostataka. Upotrebom kemijskih fungicida lako se izaziva otpornost mikroorganizama te se teško razgrađuju, dok su biološki konzervansi dobiveni iz prirodnih izvora u prednosti zbog zaštite okoliša i promicanja zdravlja (Song i sur., 2022).

Bob na usjevima oprašuju kukci i to većinom bumbari (Eckerter i sur., 2022).

Nakon žetve bob ima visoku vlažnost. Kako bi skladištenje bilo što učinkovitije, potrebno je provesti dehidraciju. Bob se smatra jednom od vlažnijih sjemenki. Tijekom procesa dehidracije dolazi i do oštećenja zrna koje čini 25 % godišnje. Najčešće primijenjene metode su sušenje vrućim zrakom i liofilizacija. Proces sušenja vrućim zrakom može uzrokovati toplinsko oštećenje dok se kod liofilizacije smrzne cijeli proizvod čime se omogućava

smanjenje volumena proizvoda. Međutim, problem kod liofilizacije je nastajanje kristala leda koji mogu uzrokovati gubitak kvalitete. Također, uočeno je kako je veći utrošak energije kod liofilizacije nego kod sušenja vrućim zrakom (Wang i sur., 2020).

Na bob negativno djeluju štetočine kao što su *Acyrtosiphon pisum* i *Megoura crassicauda*, no takvi štetnici su plijen za predatore. Bob je biljka koja se može samooprašiti i raste u svim vrstama tla te ako raste u tlu s visokom koncentracijom cinka doći će do njegove akumulacije (Yin i sur., 2024).

2.2. PROTEINI

Proteini se u hrani osim zbog nutritivne značajnosti koriste i kao emulgatori, stabilizatori i kao sredstva za želiranje. Sve je veća potražnja za proteinima zbog rasta populacije, društveno-ekonomskih promjena i rastuće urbanizacije. Nasuprot tome, utjecaj proizvodnje i potrošnje hrane na okoliš smanjuje potražnju za proteinima. Češće su korišteni proteini životinjskog podrijetla, no zbog njihovog štetnog utjecaja počinju se poticati istraživanja kako bi se pronašli drugi izvori (Goldstein i Reifen, 2022).

2.2.1. Sastav proteina

Općenito, proteini se smatraju velikim i složenim molekulama koje su sastavljene od aminokiselina. Imaju različite funkcije u organizmu: održavaju mišićnu masu, podržavaju stanične strukture i reguliraju metaboličke aktivnosti. Izvori prehrambenih proteina su životinje i biljke te se proteini životinjskog podrijetla smatraju vrhunskim izvorom zbog sastava esencijalnih aminokiselina. Također, proteini životinjskog podrijetla imaju visoku probavljivost i biorasploživost. Nasuprot proteinima životinjskog podrijetla, proteini biljnog podrijetla siromašni su esencijalnim aminokiselinama koje su važne u prehrani te su manje probavljivi. Zbog tog razloga poželjna je kombinacija proteina u prehrani (Chandran i sur., 2024).

Mahunarke sadrže većinu esencijalnih aminokiselina, nedostaju im samo aminokiseline koje sadrže sumpor. No, taj nedostatak može se riješiti kombiniranjem mahunarki i žitarica. Mahunarke sadrže od 17 do 30 % bjelančevina. Sirovine koje sadrže proteine životinjskog podrijetla bogate su zasićenim masnim kiselinama što ima negativan utjecaj na zdravlje. Sirovine bogate proteinima biljnog podrijetla bogate su nezasićenim masnim kiselinama (Goldstein i Reifen, 2022).

Ovisno o tome koje aminokiseline sadrže, razlikuje se i ponašanje proteina prilikom pripreme, obrade, skladištenja i konzumacije hrane. Poželjne fizikalne i kemijske karakteristike proteina kod prerade hrane su: sposobnost topljenja u vodi i masti, sposobnost stvaranja emulzija, pjene i gela, zgušnjavanja i sposobnost povezivanja s okusima (Chandran i sur., 2024).

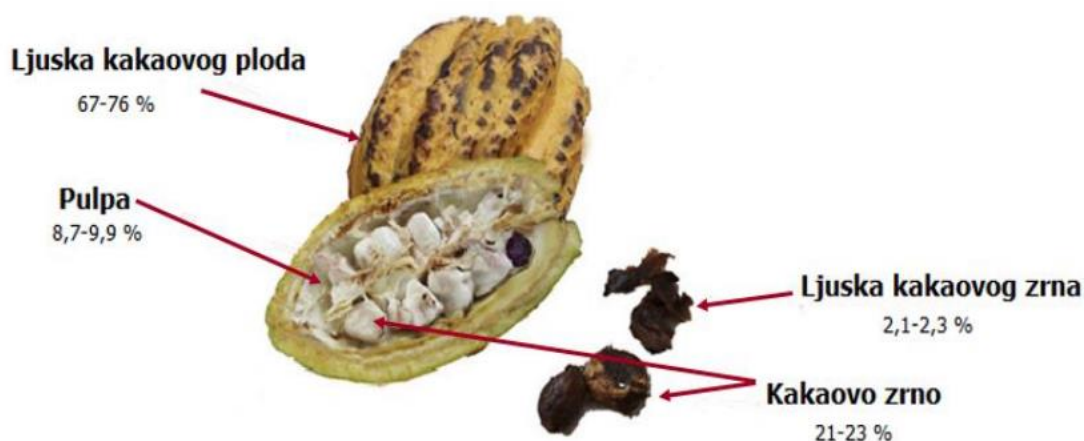
Svojstva proteina kao što su emulgiranje, pjenjenje i geliranje omogućuju široku ugradnju proteina u različite prehrambene proizvode kao što su ekstrudirana, fermentirana hrana, proteinske grickalice, gelovi za premazivanje. Također, pokušava se proizvesti i jestiva ambalaža na bazi proteina mahunarki (Goldstein i Reifen, 2022).

Mahunarke su važan izvor proteina u ljudskoj prehrani, no konzumacija mahunarki u svijetu je dosta niska. Kako bi se povećala konzumacija mahunarki, provode se različita istraživanja poboljšanja njihove probavljivosti (King i sur., 2024).

2.3. KAKAOVA LJUSKA

Kakao je proizvod koji se dobiva iz sjemenki stabla kakaovca (*Theobroma cacao*) (Slika 1), koji se uzgaja na području oko ekvatora. Razlikuju se tri glavne vrste kakaovca, a to su: *Criollo*, *Trinitario* i *Forastero* (Barišić i sur., 2023). Veliki dio ploda kakaovca otpada na mahunu (čak 80 %), a ostatak čine pulpa i sjemenke. Nusproizvodi prerade kakaovca su ljuska zrna i ljuska mahune kakaovca koji su bogati fitokemikalijama koje su pokazale pozitivan učinak na zdravlje (Ramos-Escudero i sur., 2024).

Tijekom procesa obrade kakaovih zrna dobiju se proizvodi kao što su kakaova masa, kakaov maslac i kakaov prah koje predstavljaju osnovne sastojke u industriji hrane i pića. Kakaova masa dobije se mljevenjem prženih zrna kaka, a kakaov maslac i kakaov prah odvajanjem, tj. ekstrakcijom masti (Tušek i sur., 2024). Masnoća u kakaovu zrnu čini gotovo polovicu njegove mase i koristi se za proizvodnju kakaovog maslaca koji predstavlja najvrjedniji proizvod kakaova zrna (Caporaso i sur., 2021).



Slika 1 Mahuna kakaovca (Šturlan, 2021)

Kao glavni nusproizvod prerade kakaovca ističe se ljuska. Kakaova ljuska dugo se odvajala kao otpad sve do danas kada su otkrivene brojne visokovrijedne bioaktivne komponente (Barišić i sur., 2020a). Ona predstavlja vanjski dio zrna (Benítez i sur., 2023).

Kakaova ljuska godišnje se proizvede u velikim količinama i to u svijetu više od 700 tisuća tona. Od toga na Europu otpada više od 250 tisuća tona (Barišić i sur., 2021). Zrno kakaovca važna je sirovina u brojnim industrijama kao što su: prehrambena, farmaceutska i kozmetička (Pagliari i sur., 2022).

Iako se smatra da kakaova ljuska sadrži veliku količinu komponenti koje pozitivno djeluju na zdravlje ljudi, teško ju je iskoristiti u ljudskoj prehrani. Općenito, problem industrijskog otpada stvara veliki izazov za prerađivače hrane. Izuzev velikih troškova koji se koriste za spaljivanje kakaove ljuske, veliki problem je negativan utjecaj na okoliš i na zdravlje ljudi zbog dima koji nastaje (Nsor-Atindana i sur., 2012).

Kakaova ljuska za daljnju upotrebu može se samo mljeti bez modifikacija ili se može koristiti kao alkalizirana kakaova ljuska (Panak Balentić i sur., 2018).

2.3.1. Sastav kakaove ljuske

Bioaktivne komponente koje se mogu pronaći u kakaovoj ljusci su: teobromin, kofein, katehin, galna kiselina i epikatehin (Barišić i sur., 2020a).

Zrno kakaovca je glavni sastojak kod proizvodnje čokolade. Zrna kaka vade se iz mahune nakon čega se fermentiraju i suše. Ljuska čini 12-20 % zrna te na taj način čini najveću količinu otpada koja nastaje preradom zrna kakaovca (Barišić i sur., 2020c).

Kakaova ljuska dobije se nakon prženja kakaovih zrna. Bioaktivne komponente u kakaovu ljusku dopijevaju tijekom fermentacije jer se bioaktivne komponente nalaze u kotiledonu, a kakaova ljuska se tijekom prženja odvaja od kotiledona (Barišić i sur., 2020a).

Zbog velike količine dijetalnih vlakana kakaova ljuska čest je predmet brojnih istraživanja vezanih za funkcionalnu hranu (Barišić i sur. 2021). Dijetalna vlakna dijele se na topiva i netopiva te se uglavnom sastoje od pektina i celuloze. Kod ljudske prehrane važan je omjer topivih i netopivih vlakana što pronalazimo kod kakaove ljuske (Barišić i sur., 2020c). Kod povećane konzumacije dijetalnih vlakana smanjuje se učestalost nekih bolesti kao što su: crijevni poremećaji, pretilost, dijabetes, kardiovaskularne bolesti i neke vrste raka. Također, smanjuje krvni tlak i razine kolesterola u serumu. Neka istraživanja govore da dijetalna vlakna imaju sposobnost vezati kolesterol, masnoću i žučne soli i na taj način ograničavaju njihovu dostupnost. Međutim, važno je naglasiti da dijetalna vlakna iz različitih izvora, ovisno o načinu pripreme i prisutnosti drugih hranjivih tvari variraju u učinkovitosti u suzbijanju hiperglikemije. Također, naglašava se kako kakaova ljuska može biti jeftin izvor dijetalnih vlakana i da taj potencijal treba iskoristiti (Nsor-Atindana i sur., 2012).

Neka istraživanja pokazuju da ekstrakti ljuske kaka imaju antioksidativna svojstva jer sadrže velike količine fenolnih spojeva kao što su katehini, procijanidini i alkaloidi. Zbog toga ekstrakt kakaove ljuske privlači brojne industrije kao izvor bioaktivnih spojeva (Pagliari i sur., 2022).

Dijetalna vlakna koja su prisutna u kakaovoj ljusci sastoje se od polisaharidne strukture u koju su ugrađeni fenolni spojevi koji se oslobađaju tijekom gastrointestinalne probave te ih vrijedna mikrobiota potencijalno transformira u bioraspoložive fenolne metabolite. Na taj način bi kakaova ljuska mogla imati pozitivni učinak na zdravlje (Benítez i sur., 2023).

2.3.2. Iskorištavanje kakaove ljuske

Korištenjem kakaove ljuske kao nusprodukta industrije kakaovca smanjuju se negativni učinci na okoliš te se na taj način povećava iskorištenje zrna u proizvodnji (Barišić i sur., 2022a).

Kako je ranije navedeno, kakaova ljuska bogata je dijetalnim vlaknima i zbog toga je prikladna za korištenje kod obogaćivanja hrane koja je siromašna dijetalnim vlaknima. Danas se kakaova

ljuska koristi i kao hrana za životinje, sirovina za biomasu i kao sredstvo za poboljšanje kvalitete tla (Barišić i sur., 2020a).

Također, istražuje se primjena kakaove ljuske u prehrani. Međutim, tu se javlja problem jer je kakaova ljuska u kontaktu s vanjskom okolinom, mikroorganizmima, mikotoksinima i pesticidima. Taj problem pokušao se riješiti prženjem, no tu se javljaju Maillardove reakcije gdje kao proizvodi nastaju različite kancerogene komponente (Barišić i sur., 2020b).

Kakaova ljuska može se koristiti i kod obrade vode. Adsorpcija je široko prihvaćena kod pročišćavanja vode, a kakaova ljuska pokazala se kao dobar adsorbent jer smanjuje sadržaj željeza i mangana preko 90 % (Susilawati i sur., 2024).

Iako se nastoji uključiti u ljudsku prehranu, i dalje se kakaova ljuska najviše koristi kao stočna hrana. Kakaova ljuska se može koristiti i u poljoprivredi za suzbijanje korova (Panak Balentić i sur., 2018).

Proizvodnja funkcionalne hrane stalno raste, a tako i potražnja za iskorištavanjem nusproizvoda visoke vrijednosti. Cilj svake industrije je osigurati gospodarenje otpadom pa tako i industrije kakaovca. Ljuska kakaovca može se koristiti u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Proizvodnja kakaovca obuhvaća sljedeće faze: uzgoj, berba i prethodna obrada, primarna prerada kakaovca i proizvodnja poluproizvoda i industrija čokolade (Barišić i sur., 2020c).

Kako je čokolada jedan od najpoželjnijih konditorskih proizvoda, zbog njezine visoke kalorijske vrijednosti, velike količine šećera i masti ne bi se trebala unositi u prevelikim količinama iako je dobar izvor polifenola. Kako bi smanjili te negativne učinke čokolade, razmatra se upotreba kakaove ljuske. No, problem je što svaka promjena sastava čokolade utječe na njezinu teksturu, okus i aromu (Barišić i sur., 2021).

Također, brojna istraživanja pokazuju da je lipidni sastav kakaove ljuske sličan lipidnom sastavu kakaovog maslaca te se istražuje mogućnost primjene kakaove ljuske kao zamjene za kakaov maslac. Rezultati istraživanja gdje su dijetalna vlakna korištena kao zamjena za masnoću, pokazali su smanjeno stvrdnjavanje tijekom skladištenja i veću vlažnost. Također, isprobano je korištenje dijetalnih vlakana iz kakaove ljuske kod proizvodnje pšeničnog kruha. U proizvodnji hrane koristi se i alkalizirana kakaova ljuska za proizvodnju kakaovog napitka posebnog okusa i bogatog vlaknima te je zaključeno da se može koristiti i kao zamjena za kakaov prah. Alkalizirana ljuska kakaovca korištena je i za proizvodnju keksa koji su pokazali veću otpornost na lomljenje u odnosu na kekse od pšenice. Ispitani su i napitci sa kakaovom ljuskom gdje su od strane potrošača najslabije ocijenjeni napitci s najviše bioaktivnih spojeva

najvjerojatnije zbog polifenola koji daju opori okus. Također, kakaova ljuska primjenjuje se i kod proizvodnje svinjskih kobasica i ekstudiranih grickalica (Barišić i sur., 2020c).

Netretirana kakaova ljuska može se koristiti kod proizvodnje biogoriva, kao sredstvo za malčiranje i kao stočna hrana. Također, kakaova ljuska korištena je i kao adsorbens za pročišćavanje voda i kod proizvodnje bioplina (Doko i sur., 2019).

Istraživanja su pokazala da dijetalna vlakna iz kakaove ljuske imaju puno pektinskih polisaharida što bi se moglo iskoristiti kao sredstvo za zgušnjavanje (Trgovac i sur., 2022).

Kakaova ljuska koristi se i kao gorivo u pogonima gdje se prerađuje sam kakaovac, kao organska tvar koja opskrbljuje tlo hranjivim tvarima i za borbu protiv korova. Uključivanjem kakaove ljuske kod proizvodnje ekstrudiranih proizvoda pristupa se razvoju novih, zdravih i ekoloških proizvoda. Kako je ekstruzija termomehanički proces gdje su prisutne visoke temperature, tlak i sile smicanja što dovodi do fizičkih i kemijskih modifikacija materijala (denaturacija proteina) i tada dolazi do oslobađanja fenolnih spojeva (Benítez i sur., 2023).

Budući da su hrenovke i hamburgeri najprihvaćeniji od potrošača u pogledu mesa, iako se smatraju nezdravim, provedena su istraživanja kako ih poboljšati. Dijetalna vlakna povezuju se s nižim rizikom nastanka kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, hipertenzije i gastrointestinalnih bolesti te je provedeno istraživanje gdje se u mesne proizvode dodaju vlakna. Kakaova ljuska poboljšala je tehnološke parametre i stabilnost emulzije te se pokazala kao dobra zamjena za škrob kod hrenovki zbog velike sposobnosti zadržavanja vode (Delgado-Ospina i sur., 2022).

Kako ljuska kakaosa sadrži brojne vrijedne komponente, provedena su brojna istraživanja gdje se umjesto klasičnih metoda ekstrakcije kod kojih je problem velika količina otapala i zagrijavanje koriste procesi mikrokapsulacije. Istraživanje se temeljilo na dobivanju fenolnih tvari iz ljuske kakaovca koji su dodani kod proizvodnje čokoladnih pločica (Grassia i sur., 2021).

2.3.3. Problemi iskorištavanja kakaove ljuske

Ono što se javlja kao problem kod iskorištavanja kakaove ljuske u prehrani ljudi je to što kakaova ljuska može sadržavati nepoželjne komponente koje je potrebno ukloniti. Kao nepoželjne komponente mogu se javiti teški metali, mikotoksini, policiklički aromatski ugljikovodici i mikroorganizmi (Barišić i sur., 2020c).

Problem mikroorganizama i mikotoksina javlja se zbog toga što se zrna kakaovca suše, fermentiraju i skladište u nehidrogeniranim uvjetima. Teški metali javljaju se u kakaovu zrnu zbog okoliša i kontakta zrna s vanjskim uvjetima te zbog toga što kakaova ljuska ima veliku

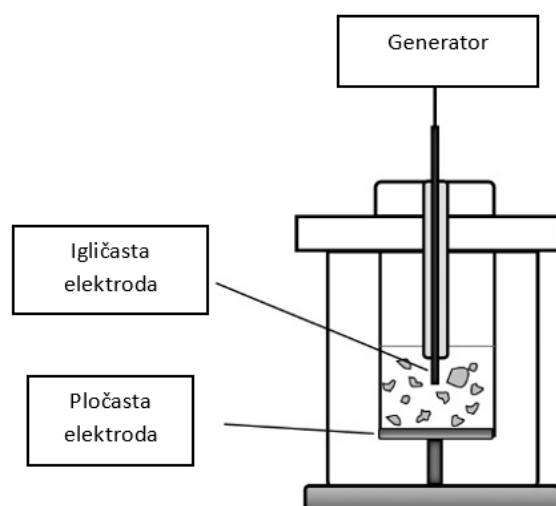
sposobnost upijanja. Najčešće su prisutni nikal, kadmij, krom i olovo. Do kontaminacije dolazi zbog gnojiva, pesticida i insekata. Kancerogenost policikličkih aromatskih ugljikovodika već dugo je poznata, a njihova prisutnost u kakaovu zrnu javlja se zbog procesa prženja i sušenja. Policiklički aromatski ugljikovodici javljaju se u hrani koja sadrži ugljikohidrate te njihova pojava u kakaovu zrnu najčešće je posljedica nepravilnog procesa sušenja kada se koristi ogrjevno drvo ili fosilna goriva. Kukci i ptice koji su prijenosnici bakterija *Escherichia coli* i *Salmonella* često dolaze u kontakt sa sjemenkama kakaovca. Iako se kakaovo zrno pržilo, *Salmonella* je pokazala otpornost na toplinu. Kako bi se smanjila kontaminacija, potrebno je provoditi higijenske mjere (Barišić i sur., 2020c).

Razlog nekorištenja kakaove ljuske u proizvodnji čokolade je to što uzrokuje probleme kod smanjenja veličine čestica u tradicionalnim procesima. Zbog toga su prije postojala ograničenja kod korištenja kakaove ljuske, no danas zbog iskorištavanja nusprodukta ta ograničenja ne postoje. Glavni sastojak kakaove ljuske su dijetalna vlakna dok su kod čokolade polifenoli s dokazanim zdravstvenim učincima (Barišić i sur., 2020d).

2.4. VISOKONAPONSKO ELEKTRIČNO PRAŽNjenje (HVED)

Visokonaponsko električno pražnjenje je jedna od tehnika koja je još u razvoju. Ona se najčešće primjenjuje u vodenom mediju, iako se može primijeniti i na biljna ulja koja su općenito slabo vodljiva (Angeloni i sur., 2022).

HVED, ukoliko se primjeni izravno u vodi, pokreće različite kemijske i fizičke procese (Boussetta i Vorobiev 2014). Također, povećava propusnost stanica i potiče oslobađanje spojeva tijekom primjene električnog polja koje se stvara između dvije elektrode. Elektroni se šire od pozitivne visokonaponske igličaste elektrode do negativne elektrode uzemljenja (**Slika 2**). Oslobodena energija proizvodi električni luk. Na sam proces utječu: unesena energija, razmak između elektroda, omjer tekućine i krutine, vrijeme obrade i otapalo. HVED je tehnika koja se primjenjuje za ekstrakciju različitih molekula kao što su polifenoli, proteini i ugljikohidrati (Hernández-Corroto i sur., 2022).



Slika 2 Dijelovi HVED-a (Carcioi i sur., 2017)

2.4.1. Primjena HVED-a

Tijekom rada HVED generira stvaranje slobodnih radikala, vodikovih peroksida, hidroksida i drugih spojeva koji mogu izazvati promjene u materijalu koji je tretiran (Barišić i sur., 2020b). Također, ova metoda zbog mogućnosti stvaranja netopivih kompleksa i oksidacije može se koristiti i za uklanjanje metala iz otpadnih voda (Barišić i sur., 2022b).

HVED je tehnika koja uzrokuje modifikaciju fizikalno-kemijske strukture vode tijekom električnog pražnjenja. Uzrok promjene strukture vode je reakcija ionizacije i disocijacije nakon kojih dolazi do stvaranja reaktivnih vrsta kisika i reaktivnih vrsta dušika.

Provode se brojna istraživanja kako bi se pronašli dobri izvori proteina biljnog porijekla. Jedan od primjera je istraživanje provedeno na lišću šećerne repe. Ekstremni uvjeti, kao što su visoka temperatura i pH, tijekom ekstrakcije značajno utječu na konačnu koncentraciju. Iz tog razloga korišten je uređaj za visokonaponsko električno pražnjenje. Osim toga, HVED se koristi za dezinfekciju površina koje dolaze u kontakt s hranom, dezinfekciju vode i za inaktivaciju enzima. HVED omogućuje veću brzinu i prinos bioaktivnih komponenata iz biljaka uz malu potrošnju energije. Međutim, kako bi metoda bila provedena što uspješnije, trebaju se osigurati optimalni uvjeti temperature, napona i vremena (Dukić i sur., 2023).

Kod ekstrakcija proteina i polifenola iz biljaka potrebno je razgraditi tkivo i stanične stijenke. Unutarstanični materijal teško je osloboditi zbog vakuola i debljine te krutosti stanične stijenke. Da bi se to postiglo, potrebno je koristiti otapala koja nisu poželjna u prehrambenoj industriji, a također se na taj način dobije niska selektivnost i dugo vrijeme ekstrakcije. To je još jedan od

razloga primjene HVED-a. On povećava propusnost stanica i potiče oslobađanje unutarstaničnih spojeva, no važno je naglasiti da to nije selektivna metoda. Kako bi se povećala selektivnost, može se raditi predtretman ekstrakcija kruto-tekuće (Hernández-Corroto i sur., 2022).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

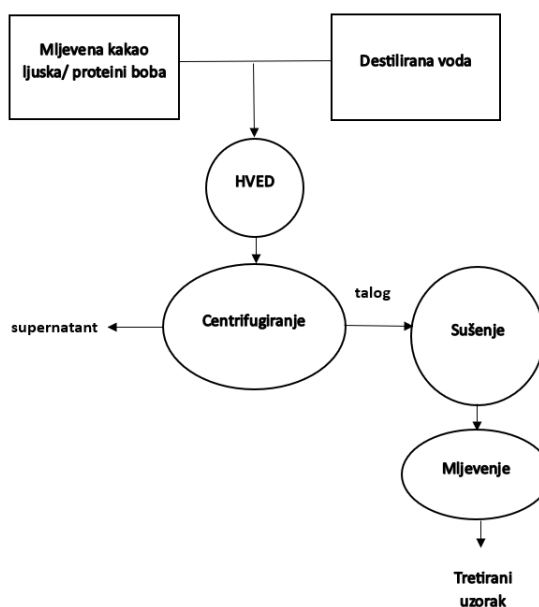
3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je tretiranje kakaove ljuske i proteina boba u uređaju za visokonaponsko električno pražnjenje (HVED-u) (**Slika 3**) te usporedba netretiranih i tretiranih uzoraka. Tretmani na HVED-u provedeni su pri:

- 20 Hz (30 sekundi, 1, 5, 10 i 20 minuta),
- 40 Hz (30 sekundi, 1, 5, 10 i 20 minuta),
- 60 Hz (30 sekundi, 1, 5, 10 i 20 minuta) i
- 80 Hz (30 sekundi, 1, 5, 10 i 20 minuta).

Metode koje su korištene za usporedbu su određivanje:

- električne vodljivosti,
- boje,
- kapacitet vezanja ulja,
- ukupni fenoli,
- svojstva pjenjenja i
- svojstva emulzije.



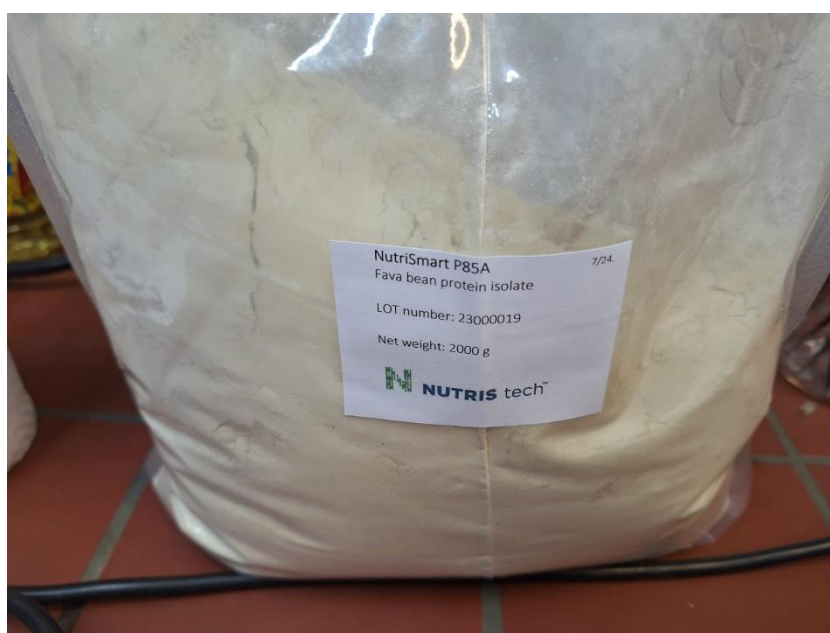
Slika 3 Blok shema tretiranja uzoraka

3.2. MATERIJAL I METODE

3.2.1. Materijali

Analize su provedene na proteinima boba branda NutriSmart 85AP (Fava bean protein isolate, LOT broj 23000019, neto težina 2000 g) (**Slika 4**) i na kakaovoj ljusci (Kandit, 11.1.2024.). Kakaova ljuska prije tretiranja na HVED-u mljevena je na mlinu IKA MF 10, pri čemu je korišteno sito promjera 1 mm.

Kod određivanja kapaciteta vezanja ulja korišteno je suncokretovo ulje Tena (**Slika 5**) (Tvornica ulja Čepin).



Slika 4 Proteini boba



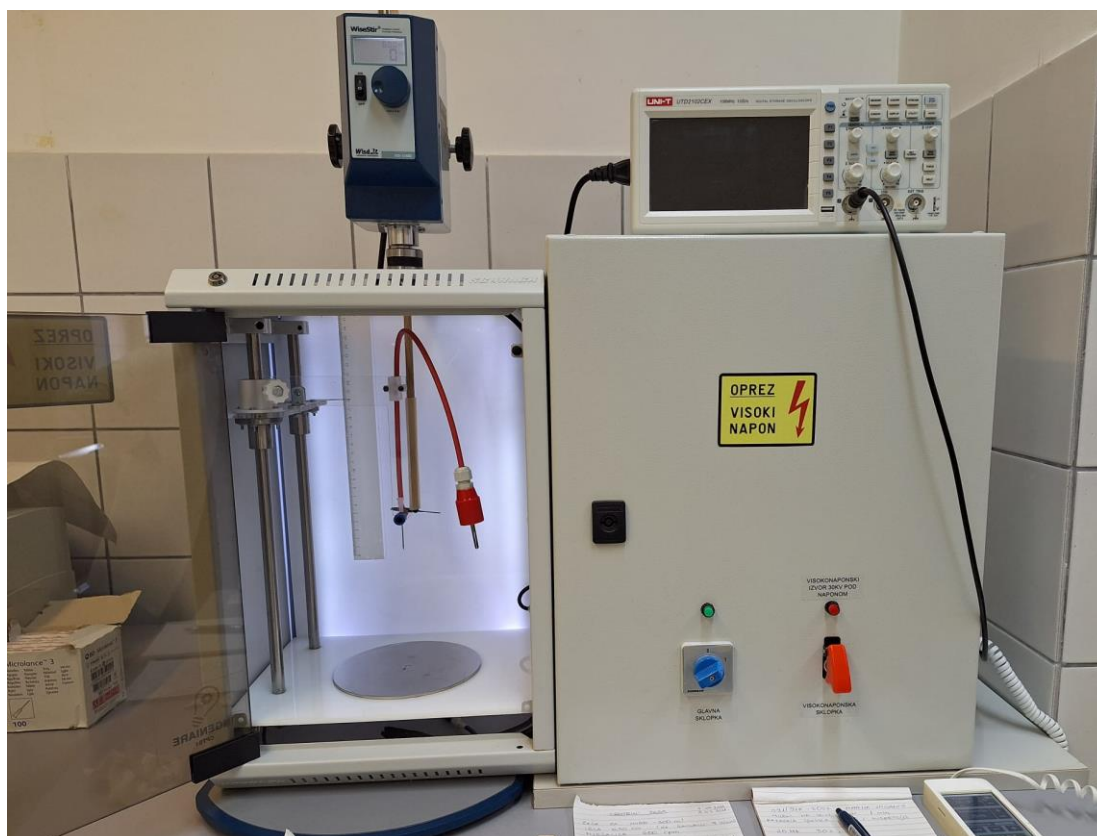
Slika 5 Suncokretovo ulje

3.2.2. Metode

3.2.2.1 Tretiranje uzoraka HVED-om

Visokonaponsko električno pražnjenje (HVED) (uređaj prikazan na **Slici 6**) smatra se ekološki prihvatljivom tehnikom i koristi se kod materijala gdje su nepoželjne visoke temperature. Također, poznato je da se na ovaj način povećava prinos bioaktivnih spojeva iz sirovina (Jokić i sur., 2019).

HVED uređaj korišten u ovom istraživanju sastoji se od: generatora impulsa koji ima promjenjivu frekvenciju od 20 do 100 Hz, automatskog upravljača uređaja (služi za podešavanje vremena tretmana, frekvencije i brzine miješanja), visokonaponske elektrode i elektrode uzemljenja te propelerske miješalice (Barišić i sur., 2020c).



Slika 6 Uređaj za visokonaponsko električno pražnjenje

Kakaova ljuska mljevena je u mlinu IKA MF 10 jednu minutu. Pripremljeno je 300 mL 10 %-tne suspenzije mljevene kakaove ljuske i destilirane vode u čaši za tretiranje HVED-om. Tretmani provedeni na HVED-u bili su na 20, 40, 60 i 80 Hz te se pri svakoj frekvenciji tretiranje provodilo 30 sekundi, 1, 5, 10 i 20 minuta. Tretmani su provedeni u dvije paralele. Nakon svakog tretmana promijenjena je izbojna elektroda na HVED-u. Tijekom tretmana razmak između visokonaponske i elektrode uzemljenja postavljen je na 0,5 cm, a miješalica na 600 okretaja/minuti. Nakon tretmana uzorci su preneseni u kivete i stavljeni u centrifugu na 3000 okretaja/minuti tijekom 20 minuta. Uzorci su zatim dekantirani te je talog prenesen u posude i stavljen u sušionik na 50 °C dok se ne osuši. Osušeni uzorci mljeveni su na mlinu gdje je korišteno sito promjera 1 mm.

Kod tretiranja proteina boba pripremljena je 20 %-tna suspenzija. Izvagano je 60 g proteina boba i dodano 240 mL destilirane vode u čašu za HVED od 300 mL. Postupak tretiranja proveden je kao i kod kakaove ljuske. Osušeni uzorci mljeveni su na mlinu gdje je prvo korišteno sito promjera 2 mm, a zatim promjera 1 mm.

3.2.2.2 Određivanje električne vodljivosti i temperature suspenzija kakaove ljuske i proteina boba prije i nakon tretmana HVED-om

Za mjerenje električne vodljivosti korišten je konduktometar (Mettler Toledo, FiveEasy FP30) (Slika 7). Općenito, električna vodljivost predstavlja brzinu prijenosa električnog naboja kroz neki analit te se mjerenje provodi pomoću konduktometrijske ćelije koja je staklena i elektrode koja je platinasta pločica (Solić, 2021).



Slika 7 Konduktometar

Na početku rada provedena je kalibracija uređaja destiliranom vodom. Svaki dan je izmjerena električna vodljivost vode koja je korištena u postupku tretiranja uzoraka u HVED-u. Nakon što je pripremljen uzorak za tretiranje na HVED-u prema postupku opisanom gore, izmjerena je električna vodljivost i pri svakom mjerenju električne vodljivosti mjerena je i temperatura. Također, nakon svakog tretiranja uzorka ponovno je mjerena električna vodljivost. Mjerenje je provedeno na način da se elektroda uroni u uzorak te su vrijednosti dobivene u mS/cm. Nakon svakog mjerenja elektroda je isprana destiliranom vodom.

3.2.2.3 Određivanje boje kakaove ljuske i proteina boba prije i nakon tretmana HVED-om

Mjerenje boje provedeno je kolorimetrom (Konica Minolta Chroma Meter CR-400) s nastavkom za praškaste materijale (Slika 8). Mjerenje je provedeno u vidljivom dijelu spektra, a princip mjerenja baziran je na stupnju reflektirane svjetlosti. Mjerenje je provedeno u sustavu

3. Eksperimentalni dio

gdje se očitavaju a^* , b^* , L^* , C i h° vrijednosti. Vrijednost a^* pokazuje odnos između crvene i zelene boje (negativne vrijednosti označavaju zelenu, a pozitivne crvenu), b^* vrijednost odnos između žute i plave (negativne vrijednosti označavaju plavu, a pozitivne žutu), a L^* vrijednost određuje svjetlinu (crna (0 %) i bijela (100 %)) (Majhen, 2019). C vrijednost pokazuje zasićenost boje (0 % daje sivu boju, a 100 % čistu boju), a h° vrijednost pokazuje ton boje (može poprimiti vrijednosti od 0-360°) (Balen, 2019).



Slika 8 Kolorimetar

Prije početka mjerenja provedena je kalibracija uređaja standardnom bijelom pločicom. Mjerenje za svaki uzorak ponovljeno je pet puta. Na kraju su izračunate vrijednosti ukupne promjene boje (ΔE) prema formuli (1):

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (1)$$

gdje je:

ΔE - ukupna promjena boje,

L^* - svjetlina (0-crna boja, 100-bijela boja),

a* - pozitivne vrijednosti su u domeni crvene boje, a negativne vrijednosti u domeni zelene boje,
b* - pozitivne vrijednosti su u domeni žute boje, a negativne vrijednosti u domeni plave boje,
L₀, a₀ i b₀ su vrijednosti boje za netretirani uzorak.

3.2.2.4 Određivanje kapaciteta vezanja ulja kakaove ljuske i proteina boba prije i nakon tretmana HVED-om

Za određivanje kapaciteta vezanja ulja pripravljena je suspenzija 2,5 g uzorka (proteini boba/kakaova ljuska) u 30 mL suncokretovog ulja. Tako pripravljena suspenzija stajala je 30 minuta uz miješanje svakih 5 minuta na vortex miješalici. Nakon pola sata uzorci su stavljani u centrifugu te centrifugirani 15 minuta na 3000 rpm. Tijekom određivanja kapaciteta vezanja ulja mjerena je masa kivete, masa uzorka te masa kivete s talogom nakon centrifugiranja. Na kraju je izračunata vrijednost kapaciteta vezanja ulja u g/g (engl. *oil binding capacity* - OBC) prema formuli (2):

$$OBC (g/g) = \frac{\text{masa taloga}}{\text{masa uzorka}} \quad (2)$$

3.2.2.5 Određivanje ukupnih fenola u kakaovoj ljusci prije i nakon tretmana HVED-om

Određivanje ukupnih fenola provedeno je na pet uzoraka koji su imali najveći kapacitet vezanja ulja. Izvagano je 2 g svakog uzorka (dvije paralele) te je provedeno odmašćivanje s 10 mL n-heksana (HPLC čistoće), tri puta. Odmašćivanjem su uklonjeni lipidi iz uzorka. Nakon provedenog odmašćivanja, talog je prenesen na filter papir i ostavljen preko noći da n-heksan ispari. Nakon toga, uzorci su vagani na analitičkoj vagi te su zabilježene mase. Na tako odmašćenom uzorku provedena je ultrazvučna ekstrakcija s 5 mL 70 %-tnog metanola (HPLC čistoće) tijekom 30 minuta. Nakon ultrazvučne kupelji uzorci su centrifugirani na 3000 rpm 10 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant je dekantiran u odmjernu tikvicu od 10 mL te je još jednom ponovljena ekstrakcija s istom količinom 70 %-tnog metanola na ultrazvučnoj kupelji te centrifugiranje.

Ukupni fenoli određeni su metodom prema Singleton i sur. (1999). Uzorci su pripravljeni korištenjem metanolnog ekstrakta na način da je 100 µL ekstrakta preneseno u odmjernu tikvicu od 10 mL, dodano 6 mL vode i 500 µL nerazrijeđenog Folin-Ciocalteu reagensa. Zatim se mućkalo te je nakon 6 minuta dodano 1,5 mL pripravljene otopine 20 %-tnog natrijevog karbonata (p.a. čistoće). Tikvica je zatim do oznake napunjena vodom. Uzorci su dva sata

ostavljeni u mraku, a zatim je očitana apsorbancija na spektrofotometru (Shimadzu, UV-1800) na valnoj duljini 760 nm.

3.2.2.6 Određivanje svojstava pjenjenja proteina boba prije i nakon tretmana HVED-om

Određivanje svojstava pjenjenja proteina boba provedeno je na pet uzoraka koji su odabrani prema najvećem kapacitetu vezanja ulja. Pripremljena je suspenzija tako što je izvagano 5 g uzorka (u dvije paralele) te je dodano destilirane vode kako bi početni volumen iznosio 100 mL. Suspenzija je miksana mikserom na najjačoj brzini 5 minuta. Nakon miksiranja, sve je preneseno u menzuru te je očitani volumen pjene.

Za izračunavanje kapaciteta pjenjenja (FC) korištena je sljedeća formula (3):

$$FC (\%) = \frac{V (pjene)}{V (početni)} \times 100 \quad (3)$$

3.2.2.7 Određivanje svojstava emulzije proteina boba prije i nakon tretmana HVED-om

Za određivanje svojstava emulzije proteina boba odabrano je pet uzoraka prema najvećem kapacitetu vezanja ulja. Pripremljena je suspenzija proteina boba i vode (u 0,96 g proteina boba dodano 96 mL destilirane vode). U suspenziju je dodano 24 mL suncokretovog ulja. Smjesa je miješana miješalicom na 12000 rpm tijekom 3 minute. Nakon toga, 0,01 mL emulzije preneseno je u 5 mL vode s 0,1 g SDS/100 g vode te je vorteksirano. Nakon toga je izmjerena apsorbancija na 500 nm.

Na kraju je izračunat indeks emulgirajuće aktivnosti (EAI) prema formuli (4):

$$EAI (m^2 g^{-1}) = \frac{2 \cdot 2,303 \cdot A_0 \cdot N}{c \cdot \varphi \cdot 10000} \quad (4)$$

gdje je:

EAI ($m^2 g^{-1}$) - indeks emulgirajuće aktivnosti,

A₀ - apsorbancija razrijeđene emulzije odmah nakon pripreme,

N - faktor razrjeđenja (500),

C ($g mL^{-1}$) - masena koncentracija proteina u suspenziji prije emulgiranja,

φ - volumna frakcija ulja u emulziji.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Osnovni cilj ovog diplomskog rada bio je usporediti netretirane i uzorke kakaove ljuske i proteina boba nakon tretiranja visokonaponskim električnim pražnjenjem na različitim frekvencijama i tijekom različitog vremena tretiranja.

4.1. ELEKTRIČNA VODLJIVOST

Rezultate mjerenja električne vodljivosti kakaove ljuske prikazuje **Tablica 1**, a proteina boba **Tablica 2**. Usporedbom rezultata uočeno je da se električna vodljivost kod kakaove ljuske i proteina boba ne mijenja značajno kod nižih frekvencija dok se kod viših frekvencija električna vodljivost povećala. Električna vodljivost za kakaovu ljusku kretala se između 4,00 mS/cm i 5,23 mS/cm, dok se kod proteina boba kretala između 3,20 mS/cm i 4,08 mS/cm. Veća razlika vidljiva je samo kod tretiranja kakaove ljuske i proteina boba tijekom 20 minuta na 20, 40, 60 i 80 Hz.

Temperatura tijekom mjerenja električne vodljivosti za kakaovu ljusku kretala se između 21 i 28 °C, dok se temperatura prilikom mjerenja električne vodljivosti za proteine boba kretala između 21 i 33 °C. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da tijekom kraćih tretmana uzoraka nema značajne promjene temperature. Značajnije povišenje temperature vidljivo je kod uzoraka tretiranih na 20, 40, 60 i 80 Hz tijekom 10 i 20 minuta.

Nedić Tiban i sur. (2022) proveli su istraživanje na nektaru šipka s ciljem utvrđivanja učinaka HVED-a na fizikalno-kemijska svojstva. Utvrdili su da je tretman HVED-om uzrokovao povećanje električne vodljivosti u svim uzorcima zbog stvaranja pozitivno i negativno nabijenih iona.

Tablica 1 Električna vodljivost kakaove ljuske

Uzorak	Električna vodljivost prije tretmana	Temperatura prije tretmana	Električna vodljivost nakon tretmana	Temperatura nakon tretmana
30 sekundi 20 Hz	4,06±0,00	23,10±0,00	4,06±0,00	22,50±0,00
1 min 20 Hz	4,40±0,00	23,30±0,00	4,40±0,00	23,20±0,00
5 min 20 Hz	4,22±0,00	23,00±0,00	4,22±0,00	23,60±0,00
10 min 20 Hz	4,23±0,00	23,10±0,00	4,23±0,00	23,80±0,00
20 min 20 Hz	4,19±0,03	21,55±0,15	4,19±0,13	23,05±0,15
30 sekundi 40 Hz	4,14±0,02	21,40±0,03	4,34±0,10	21,50±0,00
1 min 40 Hz	4,15±0,02	21,25±0,04	4,39±0,05	21,45±0,15
5 min 40 Hz	4,15±0,03	22,00±0,05	4,58±0,03	21,75±0,15
10 min 40 Hz	4,10±0,03	21,50±0,02	4,72±0,30	22,70±0,60
20 min 40 Hz	4,18±0,09	22,75±0,06	5,04±0,25	25,05±2,05
30 sekundi 60 Hz	4,31±0,07	23,60±0,10	4,64±0,05	23,85±0,05
1 min 60 Hz	4,23±0,01	22,30±0,00	4,46±0,02	21,90±0,00
5 min 60 Hz	4,16±0,01	22,4±0,10	4,60±0,02	22,45±0,35
10 min 60 Hz	4,11±0,01	22,20±0,10	4,85±0,08	24,25±0,15
20 min 60 Hz	4,00±0,07	21,15±0,05	5,14±0,00	27,30±0,80
30 sekundi 80 Hz	4,06±0,02	21,85±0,05	4,29±0,05	21,95±0,05
1 min 80 Hz	4,07±0,07	22,15±0,15	4,39±0,05	22,15±0,25
5 min 80 Hz	4,01±0,00	22,00±0,00	4,71±0,01	23,20±0,20
10 min 80 Hz	4,04±0,02	22,35±0,15	5,06±0,01	25,00±0,00
20 min 80 Hz	4,25±0,17	23,00±0,20	5,23±0,01	27,70±0,00

Tablica 2 Električna vodljivost proteina boba

Uzorak	Električna vodljivost prije tretmana	Temperatura prije tretmana	Električna vodljivost nakon tretmana	Temperatura nakon tretmana
30 sekundi 20 Hz	3,20±0,02	22,70±0,00	3,26±0,02	23,00±0,10
1 min 20 Hz	3,27±0,00	23,60±0,10	3,34±0,01	23,50±0,10
5 min 20 Hz	3,30±0,01	23,90±0,20	3,38±0,04	23,65±0,35
10 min 20 Hz	3,23±0,02	22,05±0,35	3,39±0,01	23,40±0,10
20 min 20 Hz	3,22±0,01	22,00±0,30	3,44±0,01	23,50±0,15
30 sekundi 40 Hz	3,25±0,01	22,25±0,45	3,27±0,02	21,30±0,20
1 min 40 Hz	3,28±0,01	22,05±0,45	3,29±0,02	21,30±0,20
5 min 40 Hz	3,30±0,01	23,15±0,25	3,42±0,01	23,60±0,60
10 min 40 Hz	3,24±0,05	22,80±0,60	3,52±0,02	24,25±0,35
20 min 40 Hz	3,34±0,01	23,60±0,10	3,75±0,02	26,80±0,40
30 sekundi 60 Hz	3,25±0,03	22,45±0,05	3,28±0,01	22,30±0,30
1 min 60 Hz	3,30±0,01	22,35±0,25	3,35±0,02	22,50±0,60
5 min 60 Hz	3,35±0,03	23,20±0,50	3,49±0,01	24,80±1,60
10 min 60 Hz	3,37±0,01	23,65±0,35	3,74±0,02	26,05±0,45
20 min 60 Hz	3,27±0,08	22,95±0,55	3,90±0,02	27,70±0,00
30 sekundi 80 Hz	3,27±0,02	24,35±0,25	3,36±0,04	24,15±0,05
1 min 80 Hz	3,26±0,04	24,45±0,05	3,36±0,02	24,35±0,15
5 min 80 Hz	3,36±0,01	24,30±0,20	3,59±0,02	26,60±0,40
10 min 80 Hz	3,38±0,02	24,80±0,50	3,74±0,09	27,75±1,15
20 min 80 Hz	3,38±0,02	24,95±0,05	4,08±0,04	32,25±0,15

4.2. BOJA KAKAOVE LJUSKE I PROTEINA BOBA

Mjerenjem boje određene su ukupne promjene boje uzoraka nakon tretiranja na različitim frekvencijama i tijekom različitog vremena.

Rezultati mjerenja boje netretirane i tretirane kakaove ljuske prikazani su u **Tablici 3**. Ukupna promjena boje dobivena je računski iz formule (1). Uspoređujući rezultate tretiranja na različitim frekvencijama, najmanja ukupna promjena boje (ΔE) dobivena je na 80 Hz kod tretiranja tijekom 5, 10 i 20 minuta u odnosu na tretmane na 20, 40 i 60 Hz tijekom 5, 10 i 20 minuta. Također, vidljivo je da kakaova ljuska tretirana na 20 Hz tijekom 20 minuta ima najveću ukupnu promjenu boje (ΔE) dok je kod ostale tretirane kakaove ljuske ukupna promjena boje slična.

Do blagog posvjetljivanja uzorka došlo je kod tretiranja na 80 Hz tijekom 5 minuta jer je vidljiv blagi rast L^* vrijednosti u odnosu na netretirani uzorak. Kod uzorka tretiranog na 20 Hz tijekom 20 minuta najniža je L^* vrijednost što pokazuje da je u usporedbi s netretiranom kakaovom ljuskom uzorak potamnio.

Tablica 4 prikazuje rezultate netretiranih i tretiranih proteina boba. Usporedbom rezultata uzoraka tretiranih na različitim frekvencijama tijekom istog vremena, vidljivo je da su uzorci tretirani na 80 Hz tijekom 1, 5, 10 i 20 minuta imaju najmanju ukupnu promjenu boje (ΔE). Također, vidljivo je da je tretiranjem uzoraka tijekom 1 minute najmanja ukupna promjena boje na svim frekvencijama.

Iz tablica je vidljivo da najveću ukupnu promjenu boje (ΔE) imaju proteini boba tretirani na 60 Hz tijekom 1 minute i na 40 Hz tijekom 30 sekundi. Najmanja ukupna promjena boje je kod tretiranja proteina boba na 20 Hz tijekom 20 minuta.

Nedić Tiban i sur. (2022) proveli su istraživanje na nektaru od šipka. Rezultati pokazuju da je došlo do minimalne promjene boje kod nektara koji je pripremljen od blanširanog pirea uz tretman HVED-om u odnosu na netretirani uzorak. Takav rezultat pokazao je pozitivan učinak blanširanja na očuvanje boje.

Tablica 3 Boja netretirane i tretirane kakaove ljuske

Uzorak	a*	b*	L*	C	h°	ΔE
Netretirana kakaova ljuska	41,96±0,00	8,14±0,04	13,95±0,02	16,15±0,02	59,73±0,13	
30 sekundi 20 Hz	38,68±0,47	8,25±0,13	13,46±0,04	15,78±0,09	58,50±0,38	3,44±0,47
1 min 20 Hz	38,13±0,11	8,13±0,13	12,85±0,31	15,21±0,32	57,68±0,35	3,99±0,19
5 min 20 Hz	38,61±0,08	8,30±0,07	13,34±0,15	15,72±0,15	58,11±0,21	3,41±0,06
10 min 20 Hz	37,89±1,49	8,71±0,07	13,83±0,65	16,34±0,57	57,77±1,13	4,16±1,47
20 min 20 Hz	36,30±0,59	8,70±0,34	13,14±0,29	15,76±0,42	56,52±0,50	5,76±0,58
30 sekundi 40 Hz	39,43±0,02	8,67±0,06	14,29±0,06	16,71±0,04	58,74±0,24	2,60±0,03
1 min 40 Hz	39,78±0,48	8,82±0,06	14,70±0,27	17,14±0,25	59,01±0,36	2,44±0,33
5 min 40 Hz	40,97±1,05	8,76±0,17	15,01±0,24	17,38±0,13	59,72±0,88	1,83±0,48
10 min 40 Hz	38,44±0,21	8,61±0,13	13,68±0,27	16,16±0,29	57,79±0,27	3,57±0,21
20 min 40 Hz	38,13±0,46	8,74±0,26	13,89±0,20	16,41±0,30	57,93±0,38	3,89±0,49
30 sekundi 60 Hz	39,12±0,22	8,69±0,05	14,38±0,07	16,78±0,06	58,86±0,22	2,93±0,22
1 min 60 Hz	40,25±0,85	8,67±0,10	14,57±0,09	16,96±0,04	59,25±0,45	1,93±0,75
5 min 60 Hz	40,35±0,68	8,72±0,05	14,51±0,19	16,93±0,15	59,00±0,44	1,85±0,54
10 min 60 Hz	40,07±0,78	8,84±0,20	14,67±0,66	17,13±0,67	58,92±0,60	2,33±0,36
20 min 60 Hz	40,00±0,68	8,84±0,14	14,66±0,22	17,12±0,11	58,90±0,76	2,24±0,57
30 sekundi 80 Hz	38,09±1,10	8,93±0,07	13,98±0,89	16,60±0,77	57,38±1,57	4,06±1,03
1 min 80 Hz	39,79±1,24	8,93±0,13	14,66±0,78	17,17±0,73	58,62±0,99	2,69±0,75
5 min 80 Hz	41,51±1,26	8,78±0,04	15,17±0,61	17,53±0,54	59,91±0,96	1,96±0,11
10 min 80 Hz	40,12±0,73	8,53±0,20	14,16±0,53	16,53±0,55	58,93±0,44	2,01±0,57
20 min 80 Hz	40,38±0,57	8,78±0,06	14,55±0,30	16,99±0,23	58,90±0,66	1,86±0,41

Tablica 4 Boja netretiranog i tretiranog proteina boba

Uzorak	a*	b*	L*	C	h°	ΔE
Netretirani proteini boba	83,01±0,00	-1,97±0,03	16,17±0,02	16,29±0,02	96,93±0,11	
30 sekundi 20 Hz	74,59±0,41	-0,96±0,11	12,91±0,21	12,94±0,22	94,23±0,41	9,09±0,47
1 min 20 Hz	74,01±0,22	-1,19±0,03	13,65±0,41	13,71±0,41	94,96±0,26	9,39±0,11
5 min 20 Hz	73,61±0,09	-1,17±0,07	14,39±1,42	14,44±1,42	94,66±0,22	9,69±0,35
10 min 20 Hz	74,99±2,26	-1,01±0,12	12,03±2,46	12,06±2,46	95,05±1,56	9,58±0,84
20 min 20 Hz	78,89±1,64	-1,55±0,06	11,45±0,77	11,56±0,76	97,74±0,46	6,50±0,49
30 sekundi 40 Hz	72,61±1,49	-0,93±0,22	12,87±1,85	12,91±1,86	94,10±0,41	11,03±1,98
1 min 40 Hz	75,95±2,56	-1,37±0,17	12,44±0,91	12,52±0,88	96,37±1,23	8,24±1,79
5 min 40 Hz	76,46±2,88	-1,34±0,23	12,22±1,13	12,30±1,10	96,39±1,66	8,05±1,81
10 min 40 Hz	73,31±0,12	-1,1±0,09	12,84±0,22	12,89±0,22	94,90±0,42	10,30±0,14
20 min 40 Hz	75,87±0,42	-1,34±0,08	13,02±1,05	13,10±1,05	95,88±0,33	7,86±0,80
30 sekundi 60 Hz	75,03±1,23	-1,36±0,16	14,11±0,76	14,17±0,77	95,49±0,35	8,28±1,39
1 min 60 Hz	72,80±0,51	-0,97±0,20	13,73±0,79	13,77±0,81	94,00±0,61±	10,57±0,69
5 min 60 Hz	67,64±0,57	0,13±0,07	13,45±0,33	20,93±0,33	87,32±0,22	8,96±0,44
10 min 60 Hz	73,46±0,29	-1,24±0,07	14,50±0,39	14,55±0,40	94,88±0,17	9,73±0,35
20 min 60 Hz	76,29±2,31	-1,35±0,19	13,11±1,87	13,18±1,85	96,07±1,70	7,85±1,26
30 sekundi 80 Hz	74,58±1,51	-0,93±0,13	11,77±0,47	11,81±0,46	94,55±0,83	9,63±1,13
1 min 80 Hz	77,60±0,23	-1,22±0,08	10,35±0,20	10,42±0,21	96,71±0,31	7,99±0,31
5 min 80 Hz	76,62±0,45	1,26±0,05	10,73±0,38	10,81±0,38	96,67±0,18	8,42±0,58
10 min 80 Hz	77,16±0,11	-1,33±0,14	11,27±1,59	11,35±1,60	96,77±0,33	7,76±0,97
20 min 80 Hz	74,65±0,70	-1,28±0,08	13,67±1,59	13,73±1,59	95,38±0,32	8,91±0,21

4.3. KAPACITET VEZANJA ULJA KAKAOVE LJUSKE I PROTEINA BOBA

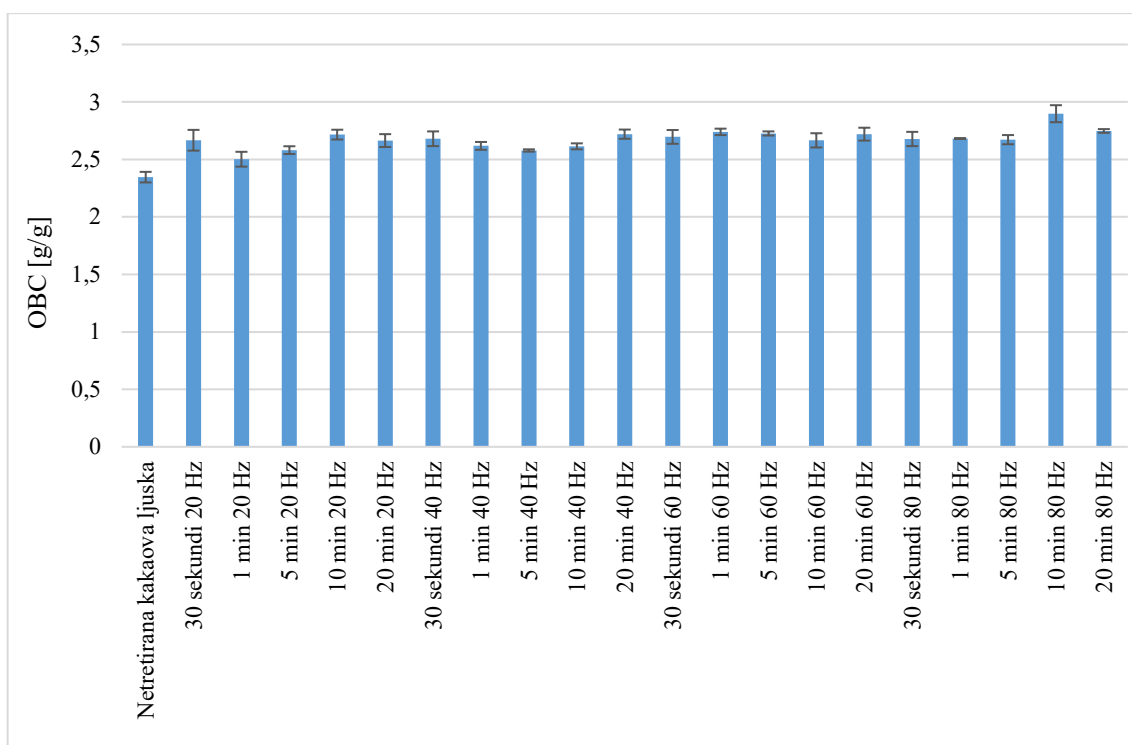
Rezultati kapaciteta vezanja ulja za netretiranu i tretiranu kakaovu ljusku prikazani su na **Slici 9**. Kapacitet vezanja ulja (OBC) dobiven je računski iz formule (2).

Iz rezultata je vidljivo da najveći kapacitet vezanja ulja imaju uzorci tretirani na 20 Hz tijekom 10 minuta, 60 Hz tijekom 1 minute, 60 Hz tijekom 5 minuta, 80 Hz tijekom 10 minuta i 80 Hz tijekom 20 minuta. Također, usporedbom rezultata uočeno je da netretirana ljuska ima manji kapacitet vezanja ulja nego bilo koji tretirani uzorak. Najmanji kapacitet vezanja ulja od tretiranih uzoraka pokazuje kakaova ljuska tretirana na 20 Hz tijekom 1 minute.

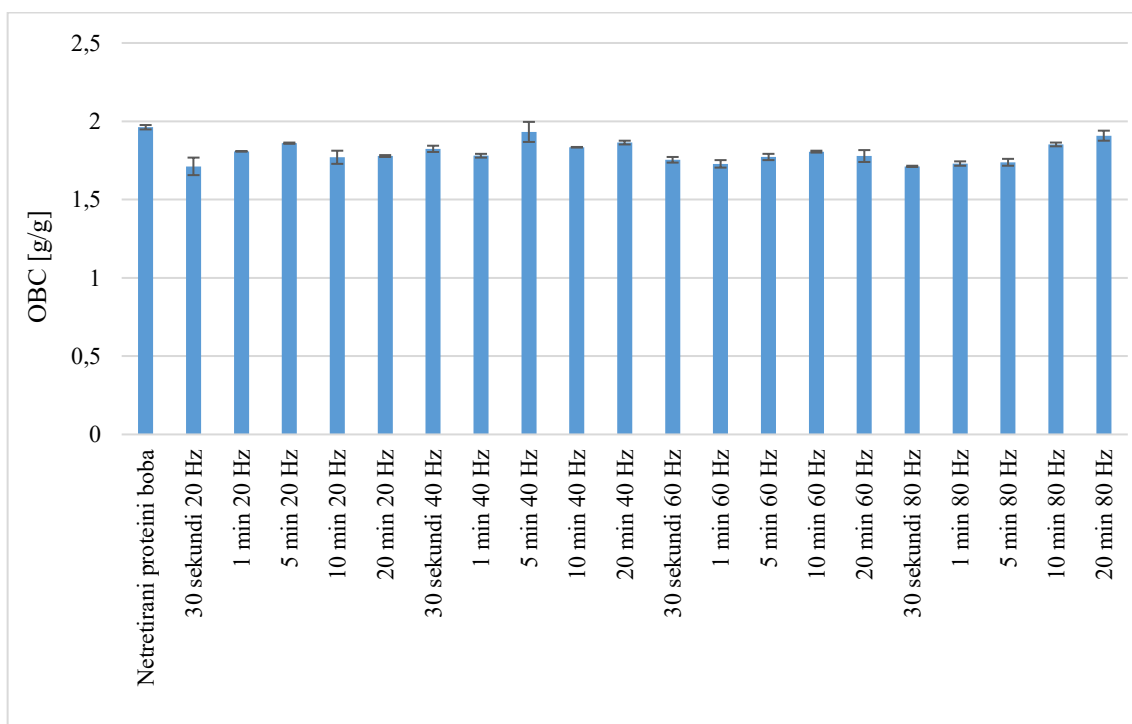
Barišić i sur. (2020a) spomenuli su kako netretirana ljuska kakaovca ima najmanji kapacitet vezanja ulja u odnosu na uzorke tretirane HVED-om te kako je sposobnost vezanja ulja povezana s veličinom čestica.

Rezultati kapaciteta vezanja ulja za netretirane i tretirane proteine boba prikazani su na **Slici 10**. Usporedbom rezultata uočeno je da uzorci tretirani na 20 Hz tijekom 5 minuta, 40 Hz tijekom 5 minuta, 40 Hz tijekom 20 minuta, 80 Hz tijekom 10 minuta i 80 Hz tijekom 20 minuta imaju najveći kapacitet vezanja ulja. Netretirani proteini boba imaju veći kapacitet vezanja ulja u odnosu na sve tretirane uzorke. Iz rezultata vidljivo je da proteini boba tretirani na 20 Hz tijekom 30 sekundi imaju najmanji kapacitet vezanja ulja.

Zhang i sur. (2024) proveli su istraživanje na proteinima soje koji su dobiveni ekstrakcijom i kiselim taloženjem iz sojinih pahuljica. U istraživanju su određeni kapaciteti vezanja ulja za 14 različitih tipova izoliranih sojinih proteina te su zaključili da se alifatski lanci kapljica ulja mogu vezati na nepolarne bočne lance aminokiselinskih ostataka pa zbog toga proteini s većom hidrofobnošću imaju veći afinitet vezanja ulja.



Slika 9 Prikaz kapaciteta vezanja ulja kakaove ljuske



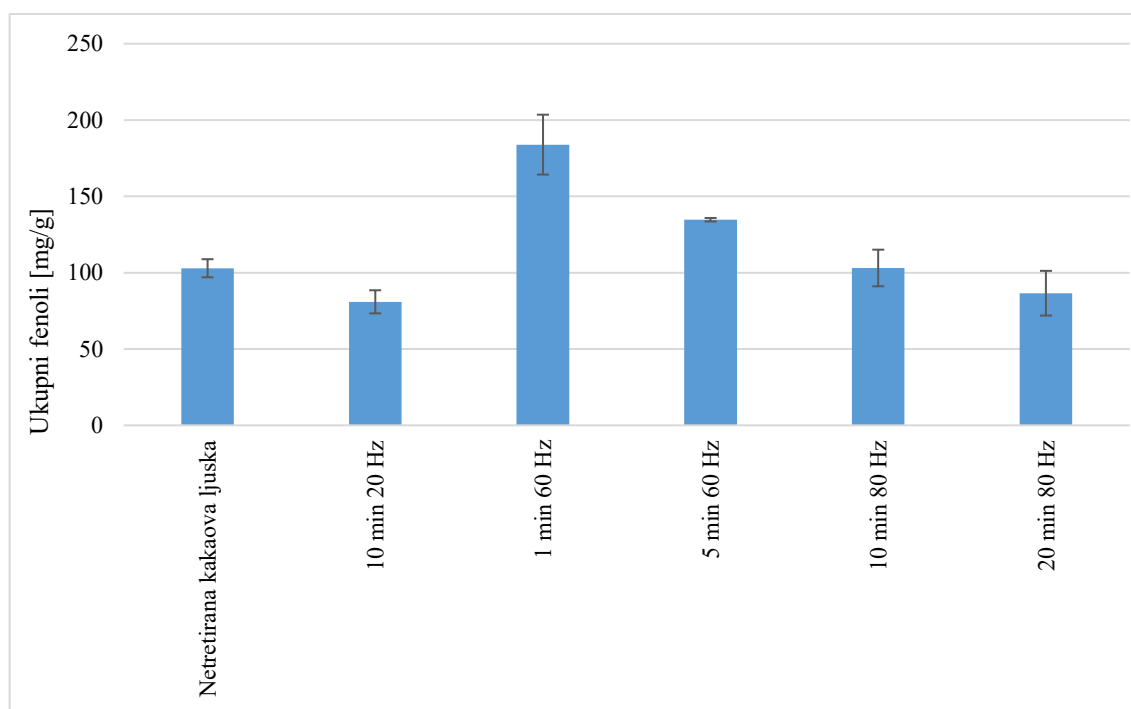
Slika 10 Prikaz kapaciteta vezanja ulja proteina boba

4.4. UDIO UKUPNIH FENOLA U KAKAOVOJ LJUSCI

Rezultati određivanja udjela ukupnih fenola za netretiranu i tretiranu kakaovu ljusku prikazani su na **Slici 11**. Udio ukupnih fenola za tretiranu i netretiranu kakaovu ljusku kretao se od 80,89 mg/g do 183,87 mg/g.

Usporedbom rezultata uočeno je da je najveća količina ukupnih fenola kod uzorka tretiranog na 60 Hz tijekom 1 minute, a najmanja kod uzorka tretiranog na 20 Hz tijekom 10 minuta. Također, kakaova ljuska tretirana na 60 Hz tijekom 1 minute i 5 minuta pokazuje veći udio ukupnih fenola od netretirane kakaove ljuske dok su ostali tretmani pokazali manji udio ukupnih fenola u odnosu na netretiranu kakaovu ljusku.

Barišić i sur. (2020e) istraživali su kako će na sadržaj polifenola i vlakana utjecati tretman HVED-om te su uočili da se sadržaj svih polifenolnih komponenti smanjio. Mehanizam zadržavanja fenolnih komponenata nakon tretmana HVED-om još nisu u potpunosti razjašnjeni, ali jedna od teorija je interakcija fenola s drugim sastojcima hrane (Barišić i sur., 2020b).



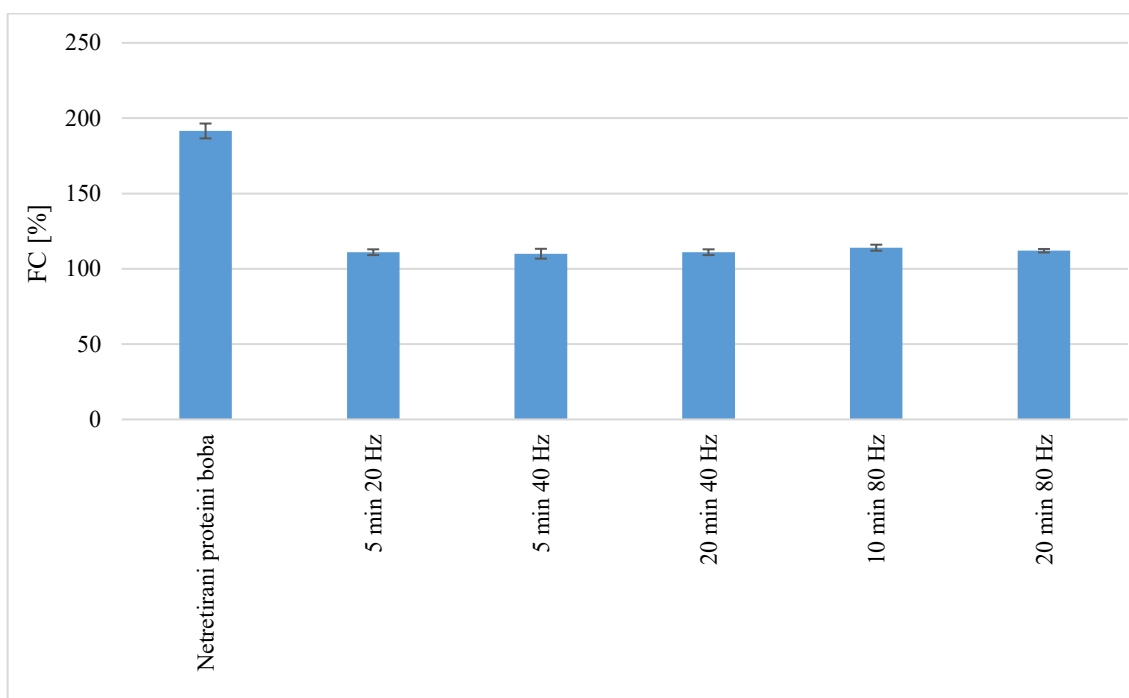
Slika 11 Udio ukupnih fenola kakaove ljuske

4.5. SVOJSTVA PJENJENJA PROTEINA BOBA

Rezultati pjenjenja za netretirane proteine boba prikazani su na **Slici 12**. Kapacitet pjenjenja (FC) dobiven je računski iz formule (3). Iz rezultata je uočeno da, među tretiranim uzorcima, najveće svojstvo pjenjenja pokazuju uzorci tretirani na 40 Hz tijekom 20 minuta i na 80 Hz tijekom 10 minuta, a najmanje tretirani na 40 Hz tijekom 5 minuta.

Netretirani proteini boba pokazuju značajno veće svojstvo pjenjenja u odnosu na sve tretirane uzorke. Rezultati pokazuju da tretmani HVED-om smanjuju svojstva pjenjenja proteina boba.

Općenito, pjena je koloidni sustav koji se sastoji od dvije faze: tekuće (koja je kontinuirana) i plinovite (koja je raspršena). Provedeno je istraživanje na proteinima sirutke gdje su promatrana svojstva pjenjenja proteina. Uspoređivali su se proteini sirutke i proteini sirutke kompleksirani sa sojinim izoflavonima. Istraživanje je pokazalo da je kompleksiranje poboljšalo svojstva pjenjenja zbog toga što je kompleksiranje povećalo topljivost proteina sirutke (Liu i sur., 2022).



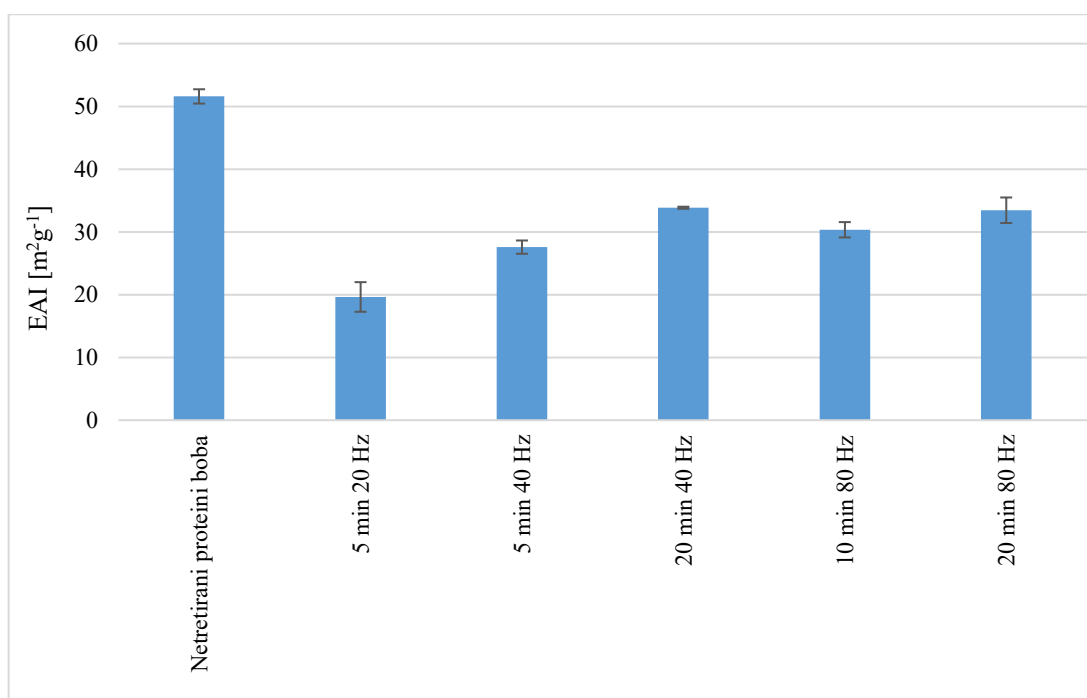
Slika 12 Svojstva pjenjenja proteina boba

4.6. INDEKS EMULGIRAJUĆE AKTIVNOSTI PROTEINA BOBA

Rezultati indeksa emulgirajuće aktivnosti za netretirane i tretirane proteine boba prikazani su na **Slici 13**. Indeks emulgirajuće aktivnosti (EAI) dobiven je računski iz formule (4).

Usporedbom rezultata tretiranih uzoraka uočeno je da najveći indeks emulgirajuće aktivnosti ima uzorak tretiran na 40 Hz tijekom 20 minuta, a najmanji indeks emulgirajuće aktivnosti ima uzorak tretiran na 20 Hz tijekom 5 minuta. Također, uočeno je da netretirani uzorak ima najveći indeks emulgirajuće aktivnosti u odnosu na sve tretirane uzorke.

Horvitz i sur. (2024) proučavali su utjecaj visokih hidrostatskih tlakova na tehnološka svojstva ovalbumina. Indeks emulgirajuće aktivnosti bio je veći u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Pozitivan učinak visokih hidrostatskih tlakova kod povećanja emulgirajuće aktivnosti pripisuje se povećanoj međufaznoj aktivnosti zbog djelomičnog izlaganja hidrofobnih skupina.



Slika 13 Prikaz indeksa emulgirajuće aktivnosti proteina boba

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Tretiranje proteina boba i kakaove ljuske HVED-om na nižim frekvencijama ne utječe značajno na električnu vodljivost, a kod tretiranja na višim frekvencijama dolazi do povećanja električne vodljivosti.
2. Tretmani uzoraka na različitim frekvencijama tijekom različitog vremena imaju utjecaj na sve parametre boje L^* , a^* , b^* , C i h° . Tretmani HVED-om više su utjecali na ukupnu promjenu boje kod proteina boba nego kod kakaove ljuske. Na ukupnu promjenu boje kakaove ljuske najmanje utječu tretmani na 60 Hz, a najviše tretmani na 20 Hz. Kod proteina boba najmanji utjecaj na ukupnu promjenu boje imaju tretmani na 80 Hz, a najviše tretmani na 20 i 40 Hz.
3. Kapacitet vezanja ulja kod netretiranog uzorka kakaove ljuske je najmanji što znači da tretiranje HVED-om povećava kapacitet vezanja ulja kakaove ljuske. Suprotno tome, netretirani proteini boba imaju najveći kapacitet vezanja ulja što znači da tretiranje proteina boba HVED-om smanjuje kapacitet vezanja ulja.
4. Tretiranjem kakaove ljuske HVED-om pokazuje smanjenje sadržaja ukupnih fenola u usporedbi s netretiranom kakaovom ljuskom. Izuzetak se tretmani na 60 Hz tijekom 1 minute i 5 minuta koji je pokazao veći udio ukupnih polifenola u odnosu na netretirani uzorak.
5. Proteini boba koji su tretirani pokazuju manji kapacitet pjenjenja nego netretirani proteini boba, odnosno tretmani HVED-om smanjuju sposobnost pjenjenja proteina boba.
6. Svi uzorci proteina boba koji su tretirani imaju manji indeks emulgirajuće aktivnosti nego netretirani uzorak proteina boba, odnosno može se zaključiti da tretiranje HVED-om smanjuje indeks emulgirajuće aktivnosti.

6. LITERATURA

- Almamari, H.A.S., M.S. Altaweel (2023) "Performance New Entries of Broad Bean under Supplementary Irrigation Conditions," IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Vol. 1213, <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1213/1/012033>.
- Alsawaf, A., F.F.R. Ibraheem (2023) "Effect of Cultivars, Apical Pinching and Copper Nano-Fertilizer on 1-Characteristics of Vegetative Growth of Broad Bean (*Vicia Faba L.*)," IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Vol. 1214, <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1214/1/012014>.
- Angeloni, G., L. Guerrini, C. Breschi, B. Zanoni, L. Calamai, A. Parenti, P. Masella (2022) "Virgin Olive Oil Processing by High Voltage Electrical Discharge or High Hydrostatic Pressure." *Journal of Food Processing and Preservation* 46, no. 9 <https://doi.org/10.1111/jfpp.16563>.
- Atindana, J., F. Zhong, M. Kebitsamang (2012) "In Vitro Hypoglycemic and Cholesterol Lowering Effects of Dietary Fiber Prepared from Cocoa (*Theobroma Cacao L.*) Shells." *Food & Function* 3: 1044–50. <https://doi.org/10.1039/c2fo30091e>.
- Bailey, C.J., D. Boulter (1970) "The Structure of Legumin, a Storage Protein of Broad Bean (*Vicia Faba*) Seed." *European Journal of Biochemistry* 17, no. 3: 460–66. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1970.tb01187.x>.
- Balen, T. (2019) "Matematičko modeliranje kinetike promjene boje čajnog peciva s dodatkom tropa grožđa sorte Cabernet Sauvignon." Info:eu-repo/semantics/masterThesis, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. Faculty of Food Technology. Department of Food Technologies. Sub-department of Cereal Technology, <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:557744>.
- Barišić, V., Đ. Ačkar, S. Lamešić, J. Grbeš, S. Škrabal, I. Flanjak (2022) "Use of Cocoa Shell in Instant Cocoa Powders – Research of Different Hydrocolloid Additions and Drying Techniques." *Hrana u Zdravlju i Bolesti: Znanstveno-Stručni Časopis Za Nutricionizam i Dijetetiku* 11, no. 2: 50–57.
- Barišić, V., I. Flanjak, M. Kopjar, M. Benšić, A. Jozinović, J. Babić, D. Šubarić, B. Miličević, K. Doko, M. Jašić, Đ. Ačkar (2020) "Does High Voltage Electrical Discharge Treatment Induce Changes in Tannin and Fiber Properties of Cocoa Shell?" *Foods* 9, no. 6 : 810. <https://doi.org/10.3390/foods9060810>.
- Barišić, V., I. Flanjak, I. Križić, A. Jozinović, D. Šubarić, J. Babić, B. Miličević, Đ. Ačkar (2020) "Impact of High-Voltage Electric Discharge Treatment on Cocoa Shell Phenolic Components and Methylxanthines." *Journal of Food Process Engineering* 43, no. 1: e13057. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13057>.
- Barišić, V., I. Flanjak, A. Tot, M. Budeč, M. Benšić, A. Jozinović, J. Babić, D. Šubarić, B. Miličević, Đ. Ačkar. (2020) "5-Hydroxymethylfurfural and Acrylamide Content of Cocoa Shell Treated with High Voltage Electrical Discharge." *Food Control* 110: 107043. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107043>.
- Barišić, V., N. C. Icyer, S. Akyil, O. S. Toker, I. Flanjak, Đ. Ačkar (2023) "Cocoa Based Beverages – Composition, Nutritional Value, Processing, Quality Problems and New Perspectives." *Trends in Food Science & Technology* 132: 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.12.011>.

- Barišić, V., A. Jozinović, I. Flanjak, D. Šubarić, J. Babić, B. Miličević, K. Doko, Đ. Ačkar (2020) “Difficulties with Use of Cocoa Bean Shell in Food Production and High Voltage Electrical Discharge as a Possible Solution.” *Sustainability* 12, no. 10: 3981. <https://doi.org/10.3390/su12103981>.
- Barišić, V., D. Kerovec, I. Flanjak, A. Jozinović, J. Babić, Z. Lončarić, D. Šubarić, B. Miličević, Đ. Ačkar (2022) “Effect of High-Voltage Electrical Discharge Treatment on Multi-Element Content in Cocoa Shell and Chocolates with Cocoa Shell.” *LWT* 155: 112944. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112944>.
- Barišić, V., J. Petrović, I. Lončarević, I. Flanjak, D. Šubarić, J. Babić, B. Miličević, K. Doko, M. Blažić, Đ. Ačkar (2021) “Physical Properties of Chocolates Enriched with Untreated Cocoa Bean Shells and Cocoa Bean Shells Treated with High-Voltage Electrical Discharge.” *Sustainability* 13, no. 5: 2620. <https://doi.org/10.3390/su13052620>.
- Barišić, V., M. Cvijetić Stokanović, I. Flanjak, K. Doko, A. Jozinović, J. Babić, D. Šubarić, B. Miličević, I. Cindrić, Đ. Ačkar (2020) “Cocoa Shell as a Step Forward to Functional Chocolates—Bioactive Components in Chocolates with Different Composition.” *Molecules* 25, no. 22: 5470. <https://doi.org/10.3390/molecules25225470>.
- Benítez, V., M. Rebollo-Hernanz, C. Braojos, S. Cañas, A. Gil-Ramírez, Y. Aguilera, M. A. Martín-Cabrejas (2023) “Changes in the Cocoa Shell Dietary Fiber and Phenolic Compounds after Extrusion Determine Its Functional and Physiological Properties.” *Current Research in Food Science* 6: 100516. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100516>.
- Boussetta, N., E. Vorobiev (2014) “Extraction of Valuable Biocompounds Assisted by High Voltage Electrical Discharges: A Review.” *Comptes Rendus. Chimie* 17, no. 3: 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2013.11.011>.
- Caporaso, N., M. B. Whitworth, I. D. Fisk (2021) “Total Lipid Prediction in Single Intact Cocoa Beans by Hyperspectral Chemical Imaging.” *Food Chemistry* 344: 128663. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128663>.
- Carciochi, R., G. L. D'Alessandro, P. Vauchel, M. Rodriguez, S. Nolasco, K. Dimitrov (2017) „Valorization of Agrifood By-Products by Extracting Valuable Bioactive Compounds Using Green Processes.“ [10.1016/B978-0-12-811521-3.00004-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811521-3.00004-1).
- Chandran, A. S., P. Kashyap, M. Thakur (2024) “Effect of Extraction Methods on Functional Properties of Plant Proteins: A Review.” *eFood* 5, no. 3: e151. <https://doi.org/10.1002/efd.151>.
- Cheng, Y.-D., Y.-X. Bai, M. Jia, Y. Chen, D. Wang, T. Wu, G. Wang, H.-W. Yang. (2021) “Potential Risks of Nicotine on the Germination, Growth, and Nutritional Properties of Broad Bean.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 209: 111797. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111797>.
- Delgado-Ospina, J., R. Lucas-González, M. Viuda-Martos, J. Fernández-López, J.Á. Pérez-Álvarez, M. Martuscelli, C. Chaves-López (2022) “Potential of the Cocoa Shell to Improve the Quality Properties of a Burger-like Meat Product.” *Journal of Food Processing and Preservation* 46, no. 8. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16752>.
- Doko, K., V. Barišić, I. Flanjak, A. Jozinović, J. Babić, Đ. Ačkar (2019) “Mikrobiološka kvaliteta kakaove ljuske.” *Glasnik Zaštite Bilja* 42, no. 3: 22–27. <https://doi.org/10.31727/gzb.42.3.4>.

- Dukić, J., K. Košpić, V. Kelava, R. Mavrić, M. Nutrizio, B. Balen, A. Butorac, M. H. Öztop, A. Režek Jambrak (2023) “Alternative Methods for RuBisCO Extraction from Sugar Beet Waste: A Comparative Approach of Ultrasound and High Voltage Electrical Discharge.” *Ultrasonics Sonochemistry* 99: 106535. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106535>.
- Eckerter, P.W., M. Albrecht, C. Bertrand, E. Gobet, F. Herzog, S.C. Pfister, W. Tinner, M.H. Entling (2022) “Effects of Temporal Floral Resource Availability and Non-Crop Habitats on Broad Bean Pollination.” *Landscape Ecology* 37, no. 6: 1573–86. <https://doi.org/10.1007/s10980-022-01448-2>.
- Fu, B., H. Ma, H. Yang, M. Zheng, J. Zhang, Y. Li, Y. Du, et al. (2024) “Broad Bean (*Vicia Faba L.*) Caused Abnormal Lipid Metabolism in Grass Carp (*Ctenopharyngodon Idellus*) Liver: Insight from the Gut Microbiota–Liver Axis.” *Food Frontiers*, <https://doi.org/10.1002/fft2.377>.
- Goldstein, N., R. Reifen (2022) “The Potential of Legume-Derived Proteins in the Food Industry.” *Grain & Oil Science and Technology* 5, no. 4: 167–78. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2022.06.002>.
- Grassia, M., M.C. Messia, E. Marconi, Ö.Ş. Demirkol, F. Erdoğdu, F. Sarghini, L. Cinquanta, O. Corona, D. Planeta (2021) “Microencapsulation of Phenolic Extracts from Cocoa Shells to Enrich Chocolate Bars.” *Plant Foods for Human Nutrition* 76, no. 4: 449–57. <https://doi.org/10.1007/s11130-021-00917-4>.
- Hernández-Corroto, E., N. Boussetta, M.L. Marina, M.C. García, E. Vorobiev (2022) “High Voltage Electrical Discharges Followed by Deep Eutectic Solvents Extraction for the Valorization of Pomegranate Seeds (*Punica Granatum L.*)” *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 79. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103055>.
- Hernández-Corroto, E., N. Boussetta, M. L. Marina, M. C. García, E. Vorobiev. (2022) “High Voltage Electrical Discharges Followed by Deep Eutectic Solvents Extraction for the Valorization of Pomegranate Seeds (*Punica Granatum L.*)” *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 79: 103055. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103055>.
- Horvitz, S., C. Arroqui, P. Vírveda (2024) “Mild High Hydrostatic Pressure Processing: Effects on Techno-Functional Properties and Allergenicity of Ovalbumin.” *Journal of Food Engineering* 364: 111797. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2023.111797>.
- Ismail, M.M., B.Y. Ibrahim (2023) “Testing the Efficacy of Silicon and Glutathione in Inducing Systemic Resistance Against *Fusarium Solani*, The Cause of Broad Bean Root Rot.” *Mesopotamia Journal of Agriculture* 51, no. 2: 14–24. <https://doi.org/10.33899/magtrj.2023.138178.1218>.
- Jokić, S., N. Pavlović, A. Jozinović, Đ. Ačkar, J. Babić, D. Šubarić (2019) “High-Voltage Electric Discharge Extraction of Bioactive Compounds from the Cocoa Bean Shell.” *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 33, no. 2: 271–80. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1525>.
- Liu, Q., Y. Sun, J. Cheng, X. Zhang, and M. Guo (2022) “Changes in Conformation and Functionality of Whey Proteins Induced by the Interactions with Soy Isoflavones.” *LWT* 163: 113555. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113555>.
- Marček, T., H. K. Aron, T. Janda, É. Darkó (2023) “Effects of High Voltage Electrical Discharge (HVED) on Endogenous Hormone and Polyphenol Profile in Wheat.” *Plants* 12: 1235. <https://doi.org/10.3390/plants12061235>.

- Majhen L. (2019) "Promjene fizikalnih svojstava jabuke „Zlatni Delišeš“ tijekom vremena skladištenja na različitim temperaturnim režimima." Završni rad. Veleučilište u Karlovcu, Stručni studij prehrambene tehnologije
- Nedić Tiban, N., M. Šimović, M. Polović, A. Šarić, I. Tomac, P. Matić, L. Jakobek (2022) "The Effect of High Voltage Electrical Discharge on the Physicochemical Properties and the Microbiological Safety of Rose Hip Nectars." *Foods* 11, no. 5: 651. <https://doi.org/10.3390/foods11050651>.
- Pagliari, S., R. Celano, L. Rastrelli, E. Sacco, F. Arlati, M. Labra, L. Campone (2022) "Extraction of Methylxanthines by Pressurized Hot Water Extraction from Cocoa Shell By-Product as Natural Source of Functional Ingredient." *LWT* 170. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114115>.
- Panak Balentić, J., Đ. Ačkar, S. Jokić, A. Jozinović, J. Babić, B. Miličević, D. Šubarić, N. Pavlović (2018) "Cocoa Shell: A By-Product with Great Potential for Wide Application." *Molecules* 23, no. 6: 1404. <https://doi.org/10.3390/molecules23061404>.
- Pasqualone, A., A. Abdallah, C. Summo (2020) "Symbolic Meaning and Use of Broad Beans in Traditional Foods of the Mediterranean Basin and the Middle East." *Journal of Ethnic Foods* 7, no. 1. <https://doi.org/10.1186/s42779-020-00073-1>.
- Ramos-Escudero, F., A. Rojas-García, M.D.L.L. Cádiz-Gurrea, A. Segura-Carretero (2024) "High Potential Extracts from Cocoa Byproducts through Sonotrode Optimal Extraction and a Comprehensive Characterization." *Ultrasonics Sonochemistry* 106. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.106887>.
- Solić, M. (2021) "Konduktometrija." Info:eu-repo/semantics/bachelorThesis, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. Faculty of Food Technology. Sub-department of Applied Chemistry and instrumental Methods. Physical Chemistry, <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:349835>.
- Song, J., H. Chen, X. Zhang, and C. Liu. (2022) "Dynamics of Microbial Communities of Fresh Broad Bean Pods and Screening of Biological Preservatives." *LWT* 170. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114048>.
- Susilawati, S., A.R. Rizki, M. Irma (2024) "Preparation and Characterization of Cocoa Shell - Pahae Natural Zeolite as a Metal Adsorption Material for Iron (Fe) and Manganese (Mn) in Water," Vol. 2733, <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2733/1/012006>.
- Šturlan M. (2021) „Ljuske kakaovog ploda i kakaovog zrna-sastav i primjena“ Završni rad. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Preddiplomski studij Nutricionizam.
- Trgovac, M., V. Barišić, I. Flanjak, A. Jozinović, B. Miličević, J. Babić, D. Šubarić, Đ. Ačkar (2022) "Cocoa Shell as an Innovative Ingredient in Chocolate with a Strong Alcoholic Filling." *Croatian Journal of Food Science and Technology* 14, no. 2: 182–93. <https://doi.org/10.17508/CJFST.2022.14.2.03>.
- Tušek, K., D. Valinger, T. Jurina, T. Sokač Cvetnić, J. Gajdoš Kljusurić, M. Benković (2024) "Bioactives in Cocoa: Novel Findings, Health Benefits, and Extraction Techniques." *Separations* 11, no. 4. <https://doi.org/10.3390/sep11040128>.
- Wang, J., K. Zhu, Y. Wang, B. Dai, S. Liu, Y. Li. (2020) "Moisture Diffusion and Shrinkage Characteristics of Broad Bean during Low-Temperature Vacuum Drying." *International Journal of Food Properties* 23, no. 1: 2217–30. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1849277>.

- Yin, Z., Y. Xie, S. Wang, Q. Li, S. Wan, L. Chen, X. Dai, R. Wang, N. Desneux, J. Zhi, B. Tang (2024) "Bioaccumulation and Transferreing for Impacts on Cd and Pb by Aphid Consumption of the Broad Bean, *Vicia Faba L*, in Soil Heavy Metal Pollution." *Chemosphere* 360: 142429. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142429>.
- Zhang, L., Q. Li, W. Zhang, S. Bakalis, Y. Luo, R. Lametsch (2024) "Different Source of Commercial Soy Protein Isolates: Structural, Compositional, and Physicochemical Characteristics in Relation to Protein Functionalities." *Food Chemistry* 433: 137315. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137315>.