



Projekt sofinancirata Republika Slovenija in Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada.

BELJAKOVINE KOT GLAVNA SESTAVINA PREHRANSKIH DOPOLNIL

Martina Puc

Nataša Mlakar

Sandra Rupnik

Hana Trček

Alan Kacin

Beljakovine kot glavna sestavina prehranskih dopolnil

Avtorji: Martina Puc, Nataša Mlakar, Sandra Rupnik, Hana Trček, Alan Kacin

Tehnična urednica: Meta Galjot

Izdal in založil: Založba COVIRIAS, Parmova 14, 1000 Ljubljana

pretehtajte.si, telefon: 01 23 22 097, info@covirias.si

Ljubljana, avgust 2019

1. izdaja

Brezplačna publikacija

Publikacija je izdana v elektronski obliki v formatu pdf.

Publikacija je objavljena na spletni povezavi: pretehtajte.si

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani
COBISS.SI-ID=301394944
ISBN 978-961-94432-5-5 (pdf)

KAZALO VSEBINE

1 UVOD.....	5
2 OSNOVNE ZNAČILNOSTI BELJAKOVIN.....	7
2.1 ZGRADBA BELJAKOVIN	9
2.2 POIMENOVAJE BELJAKOVIN.....	10
2.3 KONCENTRIRANI BELJAKOVINSKI PRIPRAVKI.....	12
3 BELJAKOVINE ŽIVALSKEGA IZVORA V PREHRANSKIH DOPOLNILIH	14
3.1 MLEKO KOT VIR KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV	14
3.2 SIROTKA KOT VIR KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV.....	15
3.2.1 Pridobivanje sirotke v obliki prahu	16
3.2.2 Beljakovinski koncentrat iz sirotke	17
3.2.3 Beljakovinski izolat iz sirotke	18
3.2.4 Uporaba beljakovinskih koncentratov iz sirotke	18
3.3 KAZEIN KOT VIR KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV	19
3.3.1 Pridobivanje kazeina	19
3.4 JAJCA KOT VIR KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV	20
3.4.1 Predelava jajčnega beljaka v prah	21
3.5 RIBE KOT VIR KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV	22
3.6 PRIMERJAVE LASTNOSTI NEKATERIH KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV ŽIVALSKEGA IZVORA.....	26
4 BELJAKOVINE RASTLINSKEGA IZVORA V PREHRANSKIH DOPOLNLILIH	28
4.1 STROČNICE KOT VIR KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV	28
4.1.1 Ekstrakcija in čiščenje proteinov stročnic	31
4.2 SOJA KOT VIR KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV	31
4.2.1 Pridobivanje sojnih proteinov	33
4.3 GRAH KOT VIR KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV	34
4.3.1 Alkalna ekstrakcija in izoelektrično obarjanje	35
4.3.2 Dializa	35
4.3.3 Micelarno obarjanje	36
4.4 KONOPLJA KOT VIR KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV	36
4.4.1 Izoelektrično obarjanje	37
5 ZAKLJUČEK.....	39
6 VIRI IN LITERATURA.....	40

KAZALO TABEL

Tabela 1: Vsebnost beljakovin v mleku glede na vir.....	14
Tabela 2: Sestava kravjega mleka.....	14
Tabela 3: Sestava sladke in kisle sirotke.....	15
Tabela 4: Sestava suhe sirotke.....	16
Tabela 5: Vsebnost sirotkinih beljakovin v kravjem mleku.....	16
Tabela 6: Primerjava različnih tipov membranske separacije.....	17
Tabela 7: Značilnosti sirotkinih beljakovin.....	18
Tabela 8: Sestava kokošjega jajca, podana z masno volumskim deležem.....	20
Tabela 9: Masna koncentracija različnih beljakovin in drugih sestavin v jajčnem beljaku.....	21
Tabela 10: Postopki pridobivanja jajčnih beljakovin v obliki prahu iz jajčnega beljaka.....	22
Tabela 11: Postopek pridobivanja ribjega beljakovinskega koncentrata iz cele ribe.....	23
Tabela 12: Postopek pridobivanja ribjega beljakovinskega hidrolizata iz ribjega mesa.....	24
Tabela 13: Lastnosti nekaterih sestavin ribjih beljakovinskih hidrolizatov, vsebnosti in postopki pridelave..	24
Tabela 14: Primerjava sestave hidrolizatov iz različnih postopkov pridobivanja s sestavo surovega slanika.....	25
Tabela 15: Primerjava nekaterih lastnosti sirotke, kazeina in jajca kot koncentriranih beljakovinskih pripravkov.....	26
Tabela 16: Lastnosti sirotke in kazeina, pomembne za tehnološke postopke predelave.....	26
Tabela 17: Biološka vrednost in absorpcija določenih beljakovin.....	27
Tabela 18: Hranilna vrednost stročnic (g/100 g).	29
Tabela 19: Vsebnost nekaterih aminokislin v mg/100 g očiščene stročnice.	30
Tabela 20: Vsebnost nekaterih aminokislin v mg/100 g očiščene stročnice.	30
Tabela 21: Sestava suhega sojinega zrnja.....	32
Tabela 22: Primerjava sestave semen graha in soje ter koncentriranih beljakovinskih pripravkov iz njih v %.....	34
Tabela 23: Primerjava sestave konopljine in sojine pogače ter HPI in SPI.	37
Tabela 24: Primerjava aminokislinske sestave konopljinega izolata, sojinega izolata in kazeina.	38

1 UVOD

Beljakovine so pomembno makrohranilo v človeški prehrani, in kot take jih prikazuje tudi slovenska prehranska piramida, čeprav največji poudarek še vedno namenja vnosu ogljikovih hidratov (NIJZ 2019). Trenutno so v tej prehranski piramidi na isti nivo postavljeni mleko in mlečni izdelki, meso in ribe ter stročnice kot vir beljakovin.

Ker beljakovine sodijo med makrohranila, njihove vnosne, pričakovane, merimo v gramih. Populacijski referenčni vnos tako znaša 0,83 g beljakovin na kg telesne mase odrasle osebe obeh spolov na dan (EFSA 2012). Za 70 kg težko osebo to pomeni dobrih 58 g beljakovin dnevno.

Razumevanje potrebnih količin vnosov beljakovin nam daje uvid v primernost tehniko oblik prehranskih dopolnil. Tako so običajne tehničke oblike, ki so enostavne za doziranje (kapsule, tablete), neprimerne za beljakovine. Za kakršenkoli omembe vreden doprinos k celokupnemu vnosu beljakovin, bi namreč morali jemati zelo veliko število dozirnih tehničkih oblik (na primer za 10 % celokupnega vosa beljakovin bi potrebovali po 12 ali več kapsul na dan), obenem pa so absolutne tolerančne meje varnih odstopanj količin vnosov precej večje kot v primeru mikrohranil in še posebej na primer mikromineralov.

Zato ne preseneča, da se beljakovine v prehranskih dopolnilih na trgu pogosto pojavljajo v tehničkih oblikah, kot so prah, že pripravljeni napitki ali celo različne ploščice. Tovrstni izdelki so bili obenem na začetku namenjeni predvsem športnikom (P3 Professional 2019). Tako se prehranska dopolnila, ki kot glavno sestavino vsebujejo beljakovine, tako v laičnih kot tudi v strokovnih in znanstvenih tekstih pogosto kategorizira kot *Športna prehrana, Beljakovinski praški* in podobno. Uporaba pojma za eno ciljno populacijo ali tehničko obliko za celotno kategorijo izdelkov pa s časom ali razvojem hitro postaja omejujoča in celo zavajajoča. Čeprav so beljakovine običajno hranilo v običajni prehrani, se lahko pojavljajo neutemeljene

predpostavke o vključevanju nedovoljenih sestavin, kot so steroidi, in splošnim strahom pred škodljivostjo tovrstnih izdelkov ali neutemeljenim zavračanjem.

V bazi P3/P3 Professional (2019) so beljakovine poleg ogljikovih hidratov¹ kot makrohranilo vključene v kategorijo *Ostalo* in tam predstavljajo podkategorijo². S tem je poudarjena posebnost makrohranil pred ostalimi glavnimi sestavinami prehranskih dopolnil, to so namreč gramski vnosi. Iz te lastnosti (tehnološke oblike in količine dnevnega vnosa) izhaja tudi težko prepoznavna meja med prehranskimi dopolnili, ki vsebujejo beljakovine kot glavno sestavino, in nadomestki obrokov, bodisi posameznih ali dnevnih. Tako je lahko dvoumno, ali nadaljevalne mlečne formule predstavljajo nadomestke posameznih obrokov ali dopolnilo k običajni prehrani.

Zaradi vsega naštetega je zelo pomemben razvoj transparentnosti sestave prehranskih dopolnil z beljakovinami, ki imajo svoje specifike. Kaj zaužijemo, ko pojemo tovrstno živilo, je odvisno tako od vira oziroma surovin kot tudi postopka predelave in proizvodnje. Vsi ti faktorji poleg namena uporabe vplivajo tako na prehransko vrednost kot tudi na varnost in parametre kakovosti izdelkov na trgu.

¹ Med ogljikovimi hidrati so tudi različne vlaknine.

² Kategorizacija prehranskih dopolnil v bazi P3/P3 Professional je avtorsko delo Martine Puc.

2 OSNOVNE ZNAČILNOSTI BELJAKOVIN

S pojmom beljakovine označujemo kompleksne organske molekule, sestavljene iz dolgih verig aminokislin. Imajo visoko prehransko vrednost in so vključene v kemijske procese, bistvene za življenje. Beljakovine s podobnimi funkcijami imajo podobno sestavo in podobno zaporedje aminokislin (Koshland and Haurowitz 2019).

Poznamo kar 500 različnih aminokislin, vendar se jih naravno pojavlja v beljakovinah le 20. Od tega jih je 8 življenjsko pomembnih za človeka, imenujemo jih esencialne beljakovine. Mednje sodijo: treonin, valin, levcin, izolevcin, metionin, fenilalanin, triptofan in lizin. Za otroke in mladostnike sta poleg naštetih esencialni še arginin in histidin. Teh aminokislin telo samo ne more sintetizirati, vendar so nujno potrebne za rast in razvoj ter zdravje človeka (Kodele et al. 1997).

Vrednost beljakovin opredeljuje vsebnost tiste esencialne aminokisline, ki jo ima beljakovina najmanj. To aminokislino imenujemo limitirajoča aminokislina in ta vpliva na biološko vrednost beljakovine³. Več esencialnih aminokislin vsebujejo beljakovine živalskega izvora, zato imajo le-te visoko biološko vrednost. Nasprotno, beljakovine rastlinskega izvora vsebujejo manj esencialnih aminokislin, zato je njihova biološka vrednost nižja (Kodele et al. 1997).

Beljakovine delimo na enostavne beljakovine ali proteine in na sestavljene beljakovine ali proteide. Enostavne beljakovine so zgrajene samo iz aminokislin, sestavljene beljakovine pa imajo poleg aminokislin še nebeljakovinsko komponento molekule, ki jo imenujemo prostetična skupina. Enostavne beljakovine glede na obliko delimo na globularne in fibrilarne beljakovine. Globularne so molekule bolj ali manj kroglastih oblik, fibrilarne pa molekule podolgovatih oblik. Med globularne beljakovine spadajo albumini in globulini ter žitni lepek (gluten), med fibrilarne pa kolagen in miozin ter aktin. Sestavljene beljakovine delimo glede na njihovo prostetično

³ Biološka vrednost beljakovin nam pove, kolikšen delež zaužitih beljakovin se je pretvoril v telesu lastne beljakovine. Izraža se v odstotkih in njena najvišja vrednost je 100 (Suwa Stanojević 2010).

skupino na glikoproteine (protein + polisaharid), lipoproteine (protein + lipid), fosfoproteine (protein + fosforna kislina), kromoproteine (protein + barvilo), nukleoproteine (protein + nukelinska kislina) in metaloproteine (protein + kovinski ion) (Schlieper et al. 1997).

2.1 ZGRADBA BELJAKOVIN

Beljakovine so sestavljene iz različnih atomov; ogljika, vodika, kisika in dušika ter včasih tudi žvepla in fosforja. Ti elementi tvorijo osnovno molekulo, aminokislino. Več 100 aminokislin pa tvori beljakovino. Ime aminokislina izvira iz njene kemijske sestave, ogljikov atom v molekuli ima namreč vezano amino skupino (-NH₂) ter hkrati tudi kislinsko ali karboksilno skupino (-COOH). S tem dve ma skupinama se aminokisline med seboj spajajo in tako tvorijo beljakovine. Karboksilna skupina ene aminokisline se s peptidno vezjo poveže z amino skupino druge aminokisline. Nastala spojina se imenuje dipeptid. Dipeptidi se lahko povežejo z naslednjo aminoskupino in tvorijo tripeptide, nato tetrapeptide in tako dalje. Tako se aminokisline s peptidno vezjo povezujejo v dolge polipeptidne verige. Aminokisline se nizajo v beljakovine po določenem vrstnem redu, ki je značilen za vsak organizem ali tkivo (Kodele et al. 1997).

Vsaka beljakovina ima specifično tridimenzionalno (3D) obliko. Različne prostorske oblike, ki jih tvorijo beljakovine brez pretrganja vezi, imenujemo nativna konformacija. Beljakovinska konformacija je organizirana na več hierarhičnih nivojih, in sicer na primarni, sekundarni, terciarni in kvartarni strukturi. Primarna struktura narekuje tvorbo sekundarne strukture, le-ta terciarne in tako naprej (Owusu-Apenten 2005).

Primarna struktura je konkretno zaporedje aminokislin vzdolž peptidne verige. Sosednje aminokisline so povezane s peptidnimi vezmi (Owusu-Apenten 2005).

Sekundarna struktura je lokalna konformacija aminokislin oz. delov peptidne verige. Majhne aminokisline najpogosteje tvorijo alfa-vijačnice, velike stranske verige tvorijo beta-plošče. Beta-trakove v obliki črke U tvorijo velike beljakovine, da bi zagotovile kompaktno strukturo. Povezave med alfa-vijačnicami in/ali beta-ploščami določajo super-sekundarno strukturo, le te so stabilizirane s komplementarnimi povezavami sekundarnih struktur (Owusu-Apenten 2005).

Terciarna struktura je oblika posamezne molekule beljakovine in predstavlja 3D obliko, ki jo prevzame peptidna veriga. Terciarna struktura je pravzaprav sinonim za globularno stanje s kroglasto obliko, hidrofobnim jedrom in nabito površino (Owusu-Apenten 2005).

Kvartarna struktura predstavlja skupek več beljakovinskih molekul oz. podenot, povezanih v beljakovinski kompleks. Dve povezani beljakovinski podenoti tvorita dimer, štiri do osem povezanih podenot tvori oligomer, več kot osem povezanih podenot pa tvori multimer (Owusu-Apenten 2005).

2.2 POIMENOVanje BELJAKOVIN

Za poimenovanje beljakovin obstaja več različnih baz, ki se med seboj nekoliko razlikujejo (SCOP, CATH, FSSP, Entrez, DDBSE), najpogosteje uporabljena in najbolj dodelana je Baza podatkov o strurni klasifikaciji beljakovin (SCOP), ki vsebuje podroben in celovit opis vseh znanih razmerij beljakovin. Razvrstitev beljakovin je določena z vizualnim pregledom in primerjavo struktur med sabo. Enota za razvrstitev je običajno domena. Majhne in srednje velike beljakovine imajo po eno domeno in se zato obravnavajo kot celota, domene v velikih beljakovinah so običajno razvrščene posamezno (Hubbard et al. 1999).

Beljakovine so razporejene po hierarhičnih ravneh v naslednjem vrstnem redu:

- Družina, latinsko *familia*.

Beljakovine se združujejo v družine na podlagi enega od dveh merit, ki pomenita, da imajo te beljakovine skupen evolucijski izvor. Prvič; vse beljakovine, ki imajo ostanke enake v vsaj 30% in drugič; beljakovine z manj enakostmi, vendar podobnimi funkcijami in strukturami.

- Naddružina, latinsko *genus*.

Družine, katerih beljakovine imajo manj enakih sekvenc, vendar njihove strukture in funkcionalne značilnosti kažejo, da je verjeten skupen evolucijski izvor, so združene v naddružine.

- Skupna zloženost (ang. common fold), latinsko *communem faldam*.

Naddružine in družine so definirane tako, da imajo skupno zloženost, če imajo njihove beljakovine enake večje sekundarne strukture v enaki razporeditvi in z enakimi topološkimi vezmi.

- Razred, latinsko *genus*. Različni tipi pregibov so združeni v razrede. Večina pregibov je razdeljenih v enega izmed petih strukturnih razredov:

1. Vse-alfa, beljakovine, katerih strukturo tvorijo α -vijačnice.
2. Vse-beta, beljakovine, katerih strukturo tvorijo β -plošče.
3. Alfa/beta, beljakovine, katerih strukturo tvorijo α -vijačnice in β -trakovi.
4. Alfa+beta, beljakovine, katerih strukturo tvorijo zelo ločene α -vijačnice in β -trakovi.
5. Več-domenske, beljakovine z domenami iz različnih pregibov, za katere niso znani homologi.

Drugi razredi so določeni za peptide, majhne beljakovine, teoretične modele, nukleinske kisline in ogljikove hidrate (Hubbard et al. 1999).

2.3 KONCENTRIRANI BELJAKOVINSKI PRIPRAVKI

Koncentrirani beljakovinski pripravki so v osnovi obliki prahu, ki poleg beljakovin vsebujejo zelo malo maščob in ogljikovih hidratov (Lipovšek 2013). Le-tega pa se lahko vgradi v različne druge oblike, ki so pripravljene za takojšnje uživanje, npr. različne napitke in ploščice. Prah pa se dodaja različnim napitkom ali jedem oziroma se raztopi pred uživanjem (P3 Professional 2019).

Beljakovinski koncentrati vsebujejo 20-40 % ali 70-90 % beljakovin (Dervišević and Vidmar 2009). Pridobljeni so iz naravnega vira, na primer iz mleka, jajc, soje, mesa itd. (Lipovšek 2013). Najpogosteje se koncentrirane beljakovinske pripravke pridobiva iz jajčnih beljakovin, beljakovin iz sirotke, iz mleka (kazein) in sojinih beljakovin (Dervišević and Vidmar 2009).

Imajo dolg rok uporabe, se enostavno pripravljajo in shranjujejo. Lahko so nadomestilo prehranskih beljakovin za tiste, ki želijo znižati vnos maščob in obenem povečati vnos beljakovin. Koncentrirani beljakovinski pripravki omogočajo lažji vnos beljakovin med in takoj po naporu (Lipovšek 2013).

Koncentrirane beljakovinske pripravke delimo glede na:

- vir, iz katerega so pridobljene,
- koncentriranost oziroma
- delež beljakovin na 100 g in
- glede na strukturo.

Glede na koncentriranost delimo koncentrirane beljakovinske pripravke na:

- koncentrat (pripravek z 60 do 85 g beljakovin/100 g izdelka) in
- izolat (pripravek z več kot 85 g beljakovin/100 g izdelka).

Beljakovine v izolatu so bolj čiste in s tem tudi dražje. Glede na strukturo ločimo hidrolizirane⁴ in visoko hidrolizirane beljakovine (Lipovšek 2013).

⁴ Hidrolizacija je postopek, s katerim večje beljakovine (oligopeptidi) razbijejo na manjše (dipeptidi, tripeptidi). Razbite beljakovine se hitreje absorbirajo (Lipovšek 2013).

3 BELJAKOVINE ŽIVALSKEGA IZVORA V PREHRANSKIH DOPOLNILIH

3.1 MLEKO KOT VIR KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV

Beljakovine, prisotne v mleku, so:

- kazein,
- sirotka oziroma serumski proteini,
- proteozni peptoni,
- neproteinski dušik (ang. Non-Protein Nitrogen - NPN).

Tabela 1 prikazuje vsebnost beljakovin v različnih vrstah mleka (Fox 2003).

Tabela 1: Vsebnost beljakovin v mleku glede na vir. Prirejeno po: Fox 2013.

Vrsta	Vsebnost beljakovin (%)
Človek	1,0
Krava	2,9
Ovca	4,5
Pujs	4,8
Konj	2,5
Osel	2,0

V kravjem mleku predstavlja sirotka približno 20 % vseh beljakovin, kazein pa približno 80 %.

Tabela 2 prikazuje sestavo kravjega mleka (Lipovšek 2013).

Tabela 2: Sestava kravjega mleka. Prijelojeno po: Onwulata and Huth 2009.

Sestavine	Vsebnost (g/L mleka)
Voda	873
Maščoba	37
Laktoza	48
Minerali in soli	7
Kazein	28
Sirotkine beljakovine	6

3.2 SIROTKA KOT VIR KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV

Sirotka (ang. Whey) je tekočina, ki nastane pri koagulaciji mleka in se tvori pri proizvodnji sira (Jelen, 2003; cit. po Onwulata in Huth, 2009). Sirotka je stranski produkt pri predelavi mleka, predvsem kislo sirotko se obravnava kot odpadek, ki pa ga je glede na proizvodne količine in sestavo smiselno izkoristiti (Pesta et al. 2007).

Pri pridelavi 1 kg sira nastane približno 9 litrov sirotke. Sladka sirotka nastane pri proizvodnji sira (npr. ementalec) in ima $\text{pH} \geq 5,6$. Kisla sirotka nastane pri kislinski koagulaciji sira (npr. skuta) in ima $\text{pH} \leq 5,1$ (Jelen, 2003; cit. po Onwulata in Huth, 2009). Tabela 3 predstavlja sestavo sladke in kisle sirotke, ki sta v tekoči obliki. 20 % vseh beljakovin v kravjem mleku predstavlja sirotka (ozioroma t.i. serumske beljakovine) (Fox 2003; Lipovšek 2013). V prehranski industriji poznaajo sirotkine beljakovine tudi pod imenom Laktalbumini (Fox 2003).

Tabela 3: Sestava sladke in kisle sirotke. Prijeljeno po: (Jelen 2003; cit. po Onwulata in Huth 2009).

Produkt	Beljakovine (g/L)	Laktoza (g/L)	Minerali (g/L)
Sladka sirotka	6-10	46-52	2,5-4,7
Kisla sirotka	6-8	44-46	4,3-7,2

Tržijo se tudi različni koncentrirani beljakovinski pripravki iz sirotke v obliki praškov, kot sta beljakovinski koncentrat iz sirotke (ang. Whey Protein Concentrat; WPC) in beljakovinski izolat iz sirotke (ang. Whey Protein Isolat; WPI). Vsebujejo različne delež beljakovin in mineralov, pa tudi laktoze, kar jim daje različno sladkost.

Tabela 4 predstavlja sestavo suhe sirotke (Fox 2003).

Tabela 4: Sestava suhe sirotke. Prijeljeno po: (Jelen, 2003; cit. po Onwulata in Huth, 2009).

Izdelek	Beljakovine (g/100g)	Laktoza (g/100g)	Minerali (g/100g)
WPC-35	35	50	7,2
WPC	65-80	4-21	3-5
WPI	88-92	<1	2-3
UF permeate	1	90	9

Legenda: WPC-35: Whey Protein Concentrate 35 g, beljakovinski koncentrat iz sirotke s 35 g proteinov na 100 g izdelkov; WPC: Whey Protein Concentrate, beljakovinski koncentrat iz sirotke; WPI: Whey Protein Isolate, beljakovinski izolat iz sirotke; UF permeate: tekočina, ki jo pridobijo z ultrafiltracijo.

Tabela 5 prikazuje vsebnost sirotkinih beljakovin v kravjem mleku.

Tabela 5: Sestava sirotkinih beljakovin v kravjem mleku. Prijeljeno po: de Wit 1998.

Sirotkine beljakovine	Vsebnost (g/L mleka)
β -laktoglobulin	3,2
α -laktalbulmin	1,2
Serumski albumin (govedina)	0,4
Imunoglobulini	0,8
Laktoferin	0,2
Laktoperoksidaza	0,03
Encimi	0,03

3.2.1 Pridobivanje sirotke v obliki prahu

V dvajsetih letih prejšnjega stoletja so uporabljali 4 različne metode za pridobivanje sirotke v prahu (Gillies 1974; cit. po Onwulata in Huth 2009):

- konvencionalne vroče sušilne valje za mleko,
- segrevanje do pridobitve koncentrirane tekočine, hlajenje do strjevanja, iztiskanje,
- dvostopenjsko segrevanje s paro,
- kombinacija sušenja s razprševanjem in sušenja na rotacijskih bobnih.

Dandanes je v proizvodnji od zgoraj naštetih metod v uporabi le še sušenje sirotke na vročih bobnih in strganje z lopatko (Onwulata in Huth 2009). Od leta 1970 se za pridobivanje

beljakovin iz sirotke prednostno uporablja membransko filtracijo. Tipi membranske filtracije so (Kelly 2003; Wagner, 2001, cit. po Onwulata in Huth 2009):

- ultrafiltracija (UF)⁵,
- mikrofiltracija (MF),
- elektrodializa (ED),
- nanofiltracija (NF),
- reverzna osmoza (RO).

Tabela 6 prikazuje primerjavo različnih tipov membranske separacije.

Tabela 6: Primerjava različnih tipov membranske separacije. Prirejeno po: (Kelly 2003; Wagner 2001, cit. po Onwulata in Huth 2009).

Tip	Velikost por (nm)	Ohranjene sestavine
MF	20-4000	Bakterije, micelarni kazein, maščobni globuli
UF	20-200	Sirotkini proteini
NF	<2	Laktoza
RO	<2	Ioni

Legenda: MF - mikrofiltracija, UF - ultrafiltracija, NF - nanofiltracija, RO - reverzna osmoza.

Pesta in sodelavci (2007) navajajo, da z ultrafiltracijo ali reverzno osmozo ločijo sirotko na posamezne komponente (proteini, laktoza). S kombinacijami različnih membranskih filtracij pridobijo različne beljakovinske praške iz sirotke z različno vsebnostjo beljakovin. Po membranski filtraciji sledi pršilno sušenje, da pridobijo suh produkt (Onwulata in Huth, 2009). Iz sirotke lahko s procesom mikrofiltracije ali ionske izmenjave pridobijo proteine, ki so lahko prebavljivi in imajo najvišjo biološko vrednost (Dervišević in Vidmar 2009).

3.2.2 Beljakovinski koncentrat iz sirotke

Z ultrafiltracijo sirotke pridobijo selektivno koncentracijo beljakovin, s sušenjem le-tega pa WPC, ki vsebuje od 30 do 85 % beljakovin (Fox 2003). Beljakovinski koncentrat iz sirotke s 35 g

⁵ Z ultrafiltracijo pridobijo permeat in koncentrat. Del tekočine, ki prehaja skozi membrano, je permeat. Drugi del, ki ne preide membrane, se imenuje koncentrat (Kelly 2003; Wagner 2001, cit. po Onwulata in Huth 2009).

proteinov na 100 g izdelkov (ang. Whey Protein Concentrate 35 g; WPC-35) je najbolj razširjen produkt, s 35 % vsebnostjo beljakovin (Kelly 2003, cit. po Onwulata in Huth 2009).

3.2.3 Beljakovinski izolat iz sirotke

Beljakovinski izolat iz sirotke (WPI) vsebuje od 90 % (Foedeging in Luck, 2013, cit. po Onwulata in Huth, 2009) do 95 % beljakovin (Fox 2003). Ionska izmenjava, ki ločuje beljakovine glede na njihov naboj namesto velikosti molekul, se pogosto uporablja v kombinaciji z membransko filtracijo (Foedeging in Luck, 2013, cit. po Onwulata in Huth, 2009). Po ionski izmenjavi odstranijo laktozo in soli, temu sledi izpiranje z NaCl. Sledi sušenje z razprševanjem do WPI (Fox 2003). WPI se zaradi visoke vsebnosti beljakovin uporablja v napitkih in prehranskih dopolnilih (Foedeging in Luck, 2013, cit. po Onwulata in Huth, 2009).

Sirotkine beljakovine imajo določene značilnosti, ki jih izkoriščajo pri tehnoloških postopkih pridobivanja le-teh. Tehnološki postopek s svojo značilnostjo vpliva na končni produkt sirotke, predvsem na vsebnost snovi, kar je prikazano v Tabeli 7 (Fox 2003):

Tabela 7: Značilnosti sirotkinih beljakovin. Prirejeno po: Fox 2003.

Lastnost sirotkinih beljakovin	Sestavine sirotke
Topnost pri pH 4,6	Vsebnost proteoznih peptonov
Topnost v nasičeni NaCl	Z obarjanjem dobijo imunoglobuline
Topnost po koagulaciji kazeina s sirilom	Vsebnost makropeptidov, majhna vsebnost kazeina

3.2.4 Uporaba beljakovinskih koncentratov iz sirotke

Koncentrati sladke sirotke se dodajajo sladoledu, prelivom, karamelam, čokoladi, kruhu, margarini, sirupom, krekerjem, bombonom, hrani za novorojenčke, tortam, mesu, omakam, juham, prigrizkom, sirom in sirnim izdelkom, pomarančnemu soku, pudingom (Kosikowski 1979). Koncentrati kisle sirotke se dodajajo sadnim pičam, fermentiranemu mleku, sirom, sirnim prahovom in solatnim prelivom, poznani pa so tudi hranilni napitki iz sirotke (Kosikowski 1979).

3.3 KAZEIN KOT VIR KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV

Kazein (ang. Casein) predstavlja 80 % vseh beljakovin v kravjem mleku (Lipovšek 2013), kjer se nahaja predvsem v obliki micela. Kazein oziroma kazeinogen je protein, ki ga pridobijo s kislim obarjanjem (Fox 2003).

Miceli vsebujejo tudi koloidni kalcijev fosfat (angl. Colloidal Calcium Phosphate; CCP). CCP se najbolje raztopi pri kisanju mleka na 4,6 pH pri 4° C za 30 minut, ki mu sledi segrevanje na 35° C (Fox 2003).

3.3.1 Pridobivanje kazeina

3.3.1.1 Izoelektrično obarjenje

Najpogosteje uporabljena metoda za ločevanje kazeina od ostalih proteinov je izoelektrično obarjanje ali izoelektrična precipitacija. Z izoelektričnim obarjanjem posnetega ali polnomastnega mleka ločijo beljakovine na kazein in sirotko (Fox 2003). Izoelektrično obarjanje kazeina je v industrijskem merilu pomembna metoda za produkcijo kazeina oziroma kazeinata, fermentiranih mlečnih izdelkov in sirov s kislinsko koagulacijo. Maščobe odstranjujejo s centrifugacijo (3000 x g, 30 min). Ostanek maščobe odstranijo s čiščenjem z etrom (Fox 2003).

Postopek izoelektričnega obarjanja (Fox, 2003):

- Mleku znižajo pH na približno 4,6, da se pod kislimi pogoji kazein strdi. Najpogosteje se za kisanje uporablja HCl, predvsem na Novi Zelandiji pa se uporablja tudi mlečna kislina (Nova Zelandija pridela največ industrijskega kazeina).
- Kazein se strjuje pri temperaturah nad 6 oziroma 7° C, strdek se usede oziroma sedimentira le pri centrifugaciji z nizko hitrostjo. Najprimernejša temperatura je 30 do 35° C, saj je takrat strdek robat in se ga zlahka obari od tekočine. Pri temperaturi 45° C je oborina viskozna in je težje delati z njo.

3.3.1.2 Drugi postopki pridobivanja kazeina

Drugi načini ločevanja kazeina od sirotkinih beljakovin v posnetem mleku poleg izoelektričnega obarjenja so (Fox 2003):

- ultracentrifugacija,
- centrifugacija po obogatitvi s kalcijem,
- obarjanje s soljo (z $MgSO_4$ frakcionirajo beljakovine na topne (albumini) in netopne (globulini)),
- ultrafiltracija in mikrofiltracija (ta postopek se uporablja predvsem za industrijsko pridelavo WPC; glej v razdelku o sirotki),
- filtracija z gelom,
- obarjanje z etanolom,
- obarjanje z zamrzovanjem (krio obarjanje),
- encimska koagulacija s sirilom.

3.4 JAJCA KOT VIR KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV

Kokošje jajce je sestavljeno iz jajčne lupine, jajčnega beljaka in jajčnega rumenjaka, kot je prikazano v Tabeli 8 (Kovacs-Nolan et al. 2005).

Tabela 8: Sestava kokošjega jajca, podana z masno volumskim deležem. Pritejeno po: (Li-Chan et al., 1995; cit. po Kovacs-Nolan et al., 2005).

Del kokošjega jajca	% (w/v)
Jajčna lupina	9,5 (z membrano)
Jajčni beljak	63,0
Jajčni rumenjak	27,5

Legenda: w/v = ang. weight per volume.

Za pridobivanje jajčnih beljakovin v prahu največkrat uporabljajo jajčni beljak (Lipovšek 2013). Beljakovine, prisotne v jajčnem beljaku, so ovalbumin, ovotransferin, ovomucoid, ovomucin,

lizocim, ovoinhibitor, ovomakroglobulin, cistatin in avidin, kot prikazuje Tabela 9 (Kovacs-Nolan et al. 2005).

Tabela 9: Masna koncentracija različnih beljakovin in drugih sestavin v jajčnem beljaku. Prirejeno po: Kovacs-Nolan et al. 2005 in Mine 2002.

Sestava jajčnega beljaka	Vrste beljakovin	Koncentracija (%)
Beljakovine	Ovoalbumin	54
	Ovotransferin	12,0
	Ovomucoid	11
	G2-globulin	4,0(?)
	G3-globulin	4,0(?)
	Ovomucin	3,5
	Lizocim	3,4
	Ovoinhibitor	1,5
	Ovoglikoprotein	1,0
	Ovoflavoprotein	0,8
	Ovomakroglobulin (ovostatin)	0,5
	Cistatin	0,05
	Avidin	0,05
Lipidi		0,03
Ogljikovi hidrati		0,4-0,9
Pepel		0,5-0,6

3.4.1 Predelava jajčnega beljaka v prah

Posušeni jajčni produkti imajo določene prednosti, kot so daljši rok uporabnosti ter manjši stroški transporta in shranjevanja (Mine 1995). Termični, kemični in fizikalni postopki pridobivanja praška iz jajčnega beljaka lahko spremenijo funkcionalne lastnosti jajčnih beljakovin (Mine 1995).

V Tabeli 10 so prikazani postopki pridobivanja jajčnih beljakovin v prahu iz jajčnega beljaka (Lechevalier et al. 2007; Hammershøj et al. 2004).

Tabela 10: Postopki pridobivanja jajčnih beljakovin v obliki prahu iz jajčnega beljaka. Pritejeno po: Lechevalier et al. 2007 in Hammershøj et al. 2004.

Lechevalier et al. 2007	Hammershøj et al. 2004
Jajčni beljak	Ločevanje jajčnih delov (odstranitev jajčnega rumenjaka in lupine)
↓	↓
Shranjevanje v zbiralniku, pH ujemanje	Jajčni beljak
↓	↓
Črpanje	Shranjevanje
↓	↓
Filtracija	Centrifugiranje
↓	↓
Črpanje 2	Odstranitev lizocimov z ionsko izmenjavo
↓	↓
Filtracija in visoko tlačno črpanje	Fermentacija
↓	↓
Koncentriranje z reverzno osmozo	Odstranjevanje vode z ultrafiltracijo
↓	↓
Encimska hidroliza, pH uravnavanje	Puferski zbiralnik
↓	↓
Črpanje + Filtracija + Segrevanje	Sušenje z razprševanjem
↓	↓
Sušenje z razprševanjem	Pasterizacija 90°C, 21 h
↓	↓
Sušenje s segrevanjem	Hlajenje in pakiranje

Sušenje s segrevanjem naj ne bi vplivalo na funkcionalne lastnosti produkta, kot so penjenje, mešanje in želiranje. Kontrolirano sušenje s segrevanjem celo izboljša naštete funkcionalne lastnosti (Mine 1995).

3.5 RIBE KOT VIR KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV

Industrija predelave rib ustvari več kot 60 % ostankov, kot so ribja glava, koža, plavuti, drobovje in ikre, 40 % pa se jih uporabi za prehrano ljudi (Dekkers et al. 2011).

S pregledom literature različnih avtorjev je ugotovljeno, da obstaja več hidrolizatov iz ribjih beljakovin in sicer (Chalamaiah et al. 2012):

- beljakovinski hidrolizat iz ribje kože,
- beljakovinski hidrolizat iz ribje glave,
- beljakovinski hidrolizat iz ribjega mišičevja,
- beljakovinski hidrolizat iz ribjega drobovja,
- beljakovinski hidrolizat iz ribjih jeter,
- beljakovinski hidrolizat iz ribjih kosti,
- beljakovinski hidrolizat iz ribjih iker ali jajčec.

S proteolitičnimi encimi hidrolizirajo ribje beljakovine in tako dobijo beljakovinski hidrolizat, ki vsebuje krajše peptide z do 20 aminokislin. Pri tem se uporabljo različni proteolitični encimi kot so: alkalaza, papain, pepsin, tripsin, pankreatin itd. (Chalamaiah et al. 2012). Hoyle in Merrit (1994) sta v svoji raziskavi uporabila alkalazo in papain. Tabela 11 prikazuje postopek pridobivanja ribjega beljakovinskega koncentrata, Tabela 12 pa postopek pridobivanja ribjega beljakovinskega hidrolizata (Hoyle and Merrit 1994).

Tabela 11: Postopek pridobivanja ribjega beljakovinskega koncentrata iz cele rive. Prirejeno po: Kristinsson and Rasco 2000.

Cela riba
↓
Mletje
↓
1. Ekstrakcija (20-30°C 50 min)
↓
2. Ekstrakcija (75°C 90 min)
↓
3. Ekstrakcija (75°C z azeotropičnim izopropanolom)
↓
Sušenje
↓
Mletje
↓
Presejanje za odstranjevanje delcev kosti

Tabela 12: Postopek pridobivanja ribjega beljakovinskega hidrolizata iz ribjega mesa. Prikejeno po: Kristinsson and Rasco 2000.



V Tabeli 13 so predstavljene lastnosti nekaterih ribjih beljakovinskih hidrolizatov, sestava in postopki pridelave.

Tabela 13: Lastnosti nekaterih sestavin ribjih beljakovinskih hidrolizatov, vsebnosti in postopki pridelave.

Prikejeno po: Chalamaiah et al. 2012.

Sestavina hidrolizata	Vsebnost (v % od celotne sestave)	Postopek, ki vpliva na vsebnost
Beljakovine	60-90%	-Topnost beljakovin med hidrolizo -Odstranjevanje netopnih trdnih sestavin s centrifugiranjem
Maščobe	Okrog 5%	Odstranjevanje lipidov pri centrifugiraju
Vлага	Okrog 10%	-Visoka temperatura med evaporacijo in sušenjem z razprševanjem - Vrsta ribe
Pepel	0,45-27%	-Dodajanje kisline ali baze za uravnavanje pH vrednosti

Ribji beljakovinski hidrolizati imajo visoko vsebnost beljakovin in biokativne spojine, zato se jih lahko uporablja kot hranične dodatke v različne namene in predstavljajo funkcionalne sestavine različnih živil (Chalamaiah et al. 2012).

Hoyle in Merrit (1994) v svoji raziskavi opisujeta predelavo slanika (lat. *Clupea harengus*) v beljakovinski hidrolizat neposredno iz ribje gošče surovega slanika ali s predhodnim razmaščevanjem ribje gošče bodisi z mehanskim stiskanjem ali z izpiranjem z etanolom, kar je prikazano v Tabeli 14. Nadaljnji postopek pridobivanja hidrolizata je po vseh treh postopkih enak, in sicer so ribji gošči dodali antioksidante in encime ter jih izpostavili določeni temperaturi in ustrezni pH vrednosti (alkalaza: 50-55°C, pH 8 do 8,5; papain: 60-65°C, pH 6 do 7) (Hoyle and Merritt 1994).

Tabela 14: Primerjava sestave hidrolizatov iz različnih postopkov pridobivanja s sestavo surovega slanika.

Prirejeno po: Hoyle and Merrit 1994.

%	Surov slanik (a)	Razmaščevanje s stiskanjem (a)	Razmaščevanje z etanolom (a)	Surov slanik (b)	Razmaščevanje s stiskanjem (b)	Razmaščevanje z etanolom (b)
Voda	4,7	3,9	3,3	4,8	3,2	3,9
Beljakovine	87,9	82,3	83,7	85,3	83,4	85,7
Maščobe	4,0	3,7	1,8	4,7	3,6	0,9
Pepel	12,5	13,3	12,0	9,6	9,9	7,5

Legenda: a - alkalaza, b - papain

3.6 PRIMERJAVE LASTNOSTI NEKATERIH KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV ŽIVALSKEGA IZVORA

Tabela 15: Primerjava nekaterih lastnosti sirotke, kazeina in jajca kot koncentriranih beljakovinskih pripravkov.

Prirejeno po: Lipovšek 2013.

	Sirotkine beljakovine v prahu	Kazein	Jajčne beljakovine v prahu
Vir pridobivanja beljakovine	Kravje mleko	Kravje mleko	Jajca (najpogosteje jajčni beljak)
Sestava	Večja koncentracija esencialnih aminokislin, laktoza, minerali, vitamini, laktalbumini, maščobe v sledeh	Sestava podobna sirotki, večje koncentracije glutamina, manjša koncentracija aminokislin z razvejanimi verigami	aminokisline, malo maščob, nič sladkorja, nič laktoze
Absorpcija	Hitra	Počasna	Počasna
Priporočen enkratni odmerek	15-30 g	15-30 g	15-30 g
Dodatno	Sirotka nastaja pri procesu pridelave sira in skute.	Oblike kazeina: -kot mlečna beljakovina -kot kalcijev kazeinat (<i>calcium caseinate</i>) -kot micelarni kazein (<i>micellar casein</i>)	Jajčne beljakovine pridobivajo tudi iz jajčnih odpadkov in ne le iz jajc.

Tabela 16: Lastnosti sirotke in kazeina, pomembne za tehnološke postopke predelave. Prirejeno po: Fox 2003.

	Sirotka	Kazein
Oblika v mleku	Monomeri ali majhne kvartarne strukture	Micel
Sinteza	V mlečni žlezi	V mlečni žlezi
Fosforilacija*	Ne	Da
Vsebnost žvepla (%)	1,7	0,8
Koagulacija z omejeno proteolizo	Ne	Da
Toplotna stabilnost	Visoka (tudi do 140°)**	Nizka (najbolj globularni proteini - do 90°)

Legenda: *Vsebnost fosfatne skupine na kazeinu vpliva na hidracijo, topnost, toplotno stabilnost in tvorbo kovinske vezi. **Segrevanje sirotke na visoke temperature (121°C, 83 min) povzroči obarjanje beljakovin in zmanjša visoko hranilno vrednost sirotkinih beljakovin (Sienkiewicz in Riedel 1990; cit. po Siso 1996).

Tabela 17: Biološka vrednost in absorpcija določenih beljakovin. Pritejeno po: Layman in Rodriguez 2009.

	Biološka vrednost (prirast telesne mase (g)/vnos beljakovin (g))	Absorpcija (razmerje med zaužitim in absorbiranim dušikom) (%)
Jajčni beljak	3,8	98
Mleko	3,1	95
Govedina	2,9	98
Soja	2,1	95

4 BELJAKOVINE RASTLINSKEGA IZVORA V PREHRANSKIH DOPOLNILIH

4.1 STROČNICE KOT VIR KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV

Stročnice so v naši prehrani pomemben vir proteinov. Te so primarno založni proteini, sestavljeni iz dveh osnovnih globulinov – legumina in vicilina. Identificiran je bil tudi tretji globulin, konvicilin. Založni proteini se sintetizirajo v vakuolah razvijajočih se semen in so pakirani v proteinska telesca. Preostali metabolni proteini, ki predstavljajo 13–14 % dušika v grahu, so večinoma v vodi topni albumini (Swanson 1990).

Izolacija in čiščenje posameznih proteinov iz celic, ki vsebujejo mešanico različnih, med sabo nepovezanih proteinov, je mogoča zaradi unikatnih fizikalnih in kemijskih lastnosti proteinov. Vsak protein ima točno določene lastnosti, ki jih določajo: aminokislinska sestava, njeno zaporedje, struktura, velikost, oblika, neto naboј, izoelektrična točka, topnost, topotna stabilnost ter hidrofobnost proteinskih podenot. Na osnovi teh lastnosti obstajajo številne metode izolacije, kot je na primerobarjanje s soljo⁶ (Nehete et al. 2013).

Prisotnost nekaterih naravno prisotnih zaviralnih faktorjev stročnic, kot so proteazni inhibitorji, lektini, fitati, tanini in saponini, zmanjšujejo hranično vrednost njihovih proteinov. Za izboljšanje hranične vrednosti, so razvili različne tehnike odstranjevanja in inaktivacije omenjenih faktorjev. V raziskavi Quintele in sodelavcev (1997) se je vsebnost zaviralnih faktorjev zmanjšala z uporabo postopka izoelektričnega barjanja⁷. S tem so pri izolaciji proteinov iz semen boba najbolj znižali vsebnost taninov (95 %), pri izolaciji proteinov iz graha pa se je znižala tudi vsebnost fitatov (45 %) in tripsinskih inhibitorjev (46 %) (Fernández-Quintela et al. 1997).

Funkcionalne lastnosti proteinov označujejo fizikalno-kemijske lastnosti, ki vplivajo na vedenje proteinov med predelavo, kar vpliva na kvaliteto končnega izdelka. Funkcionalne lastnosti, kot

⁶ Postopek, pri katerem se beljakovine oborijo z zvišano koncentracijo soli v raztopini, navadno z amonijevim sulfatom ali natrijevim kloridom (Amebis 2010-2017).

⁷ Kemijski postopek, pri katerem protein izločimo z vzpostavitvijo pH vrednosti, pri kateri je vsota nabojev molekule proteina v raztopini enaka nič (Oxford Reference 2019).

so topnost, viskoznost, kohezivnost, zmožnost tvorbe gelov, emulzije, pene, vezi z vodo ter barva in okus, so pomembne z vidika uporabe v prehranski industriji. Uporaba rastlinskih proteinov v živilski industriji je odvisna od razmerja med funkcionalnostjo in ceno. Lastnosti rastlinskih proteinov, ki vplivajo na njihovo funkcionalnost, so: topnost, aminokislinska sestava, konformacija, površinska hidrofobnost, občutljivost na denaturacijo ter število in moč intra- ter inter-molekularnih vezi (Swanson 1990).

Tabela 18: Hranilna vrednost stročnic (g/100 g). Prikejeno po: Černe 1997.

Stročnica	Hranilna vrednost (g/100 g)				
	Surove beljakovine	Surove maščobe	Ogljikovi hidrati	Sladkorji	Voda
Grah, svež	3,5–7,2	0,4–0,5	12–16	2,8	74–78
Grah, konzerviran	2,6–3,5	0,1–0,4	10–12	/	82–86
Grah, suh	20–25	1,1–2,1	53–62	/	9–14
Soja, sveža	9–12,5	5–6,5	6	2,8	67–73
Soja, suha	24–55	14–27	19–35	/	8–10
Sojina moka	36–39	20–22	26–28	9,9	9–10
Fižol, stročji	1,2–3	0,1–0,4	2,9–7,7	2,4	86–94
Fižol, suho zrnje	20–24	1,3–2	47–62	/	11–17

Pri večini stročnic so predvsem suha zrna bogata z beljakovinami, medtem ko pri svežih prevladujejo ogljikovi hidrati in voda, kar je prikazano v Tabela 18. Največ beljakovin in surovih maščob vsebuje suha soja, najmanj pa stročji fižol (Černe 1997).

Tabela 19: Vsebnost nekaterih aminokislin v mg/100 g očiščene stročnice. Prirejeno po: Černe 1997.

Stročnica	Aminokislina (mg/100 g)					
	Tirozin	Treonin	Triptofan	Lizin	Histidin	Arginin
Grah, svež	100–280	190–320	27–83	95–470	65–210	460–820
Grah, konzerviran	84	130	28	160	56	310
Grah, suh	740–920	810–880	160–190	1170–1680	540–630	2020–2240
Soja, suha	1290–1450	1480–1820	440–560	1560–2550	850–960	2200–2920
Sojina moka	700–1760	1100–2130	290–900	1500–3340	490–1230	2150–3390
Fižol, stročji	24–70	84–86	24–43	100–130	39–48	91–97
Fižol, suho zrnje	450–1260	550–1140	85–350	1130–2020	320–780	1000–1900

Tabela 20: Vsebnost nekaterih aminokislin v mg/100 g očiščene stročnice. Prirejeno po: Černe 1997.

Stročnica	Aminokislina (mg/100 g)					
	Izolevcin	Levcin	Valin	Metionin	Cistein	Fenilalanin
Grah, svež	250–390	310–590	210–350	18–100	42–100	160–340
Grah, konzerviran	160	220	140	27	38	130
Grah, suh	1290–1530	1600–1890	1260–1370	280	250–300	1090–1210
Soja, suha	1730–2170	3110	1550–2120	540–740	570–720	2000–2350
Sojina moka	1630–3020	2450–3600	1630–2610	270–900	410–950	1310–2250
Fižol, stročji	100	120–140	110	15–53	220	28–78
Fižol, suho zrnje	920–1430	1530–1810	1020–1520	110–390	130–1570	700–1570

V Tabeli 19 in Tabeli 20 so zbrani podatki o količini posameznih aminokislin v 100 gramih različnih stročnic. Največ tirozina, treonina, triptofana, lizina, histidina, arginina, izolevcina, levcina, valina, metionina in cisteina najdemo v sojni moki (Černe 1997). Grahovi globulini imajo visoko vsebnost arginina, fenilalanina, levcina in izolevcina, medtem ko imajo grahovi albumini višjo vsebnost triptofana, lizina in treonina. Grahu, kot tudi ostalim stročnicam, primanjkuje aminokislina, ki vsebujejo žveplo (metionin in cistein) (Stone et al. 2015).

4.1.1 Ekstrakcija in čiščenje proteinov stročnic

Začetni material za pridobivanje proteinov stročnic so sveža, na zraku posušena zrna oziroma semena. Pred ekstrakcijo mora biti semenska ovojnica odstranjena, saj le-ta mnogokrat vsebuje pigmente, fenole ali podobne snovi, ki kasneje motijo potek ekstrakcije proteinov. Pri svežih semenih je odstranitev ovojnice lahka, pri posušenih, pa postopek olajšajo z namakanjem semen v vodi ter z uporabo proteaz⁸. Semena najprej homogenizirajo na mešalniku in nato oborjajo s precipitacijo izoelektrične točke. Iz takšnega ekstrakta proteinov je priporočljivo odstraniti še ostale ne-proteinske materiale, kar lahko dosežemo zobarjanjem s soljo⁹ amonijevega sulfata (Derbyshire et al. 1976).

4.2 SOJA KOT VIR KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV

Soja (lat. *Glycine max*) je enoletna zelnata rastlina iz družine stročnic (Leguminosae ali Fabaceae), ki izvira iz Kitajske in ostalih delov Azije (Luis et al. 2015). Je rastlina zmernih do toplih območij, zato dobro uspeva v toplih pomladih, toplih in vlažnih poletjih ter zmerno toplih in vlažnih jesenih. Sojo lahko obiramo, ko je zrnje še zeleno, vendar se škrob in olje v nedozorem semenu še ne akumulirata, zato običajno počakamo, da semena dozorijo. Le-te nato posušimo in jih shranimo v suhem in zračnem prostoru, kjer vлага ne sme presegati 13 %, sicer se seme slabo shranjuje (Černe 1997). Sestava suhega sojinega zrnja je predstavljena v Tabeli 21. V primerjavi z drugimi stročnicami je pri soji vsebnost sestavin zelo uravnotežena. Vsebuje največ polnovrednih beljakovin, ki lahko nadomestijo živalske proteine (meso, mleko, jajca) (Černe 1997).

⁸ Encimi, ki pospešujejo razkroj beljakovin (ZRC SAZU, Inštituta za slovenski jezik Frana Ramovša 2018).

⁹ Postopek, pri katerem se proteini izločijo z zvišano koncentracijo soli v raztopini (ZRC SAZU, Inštituta za slovenski jezik Frana Ramovša 2018).

Tabela 21: Sestava suhega sojinega zrnja. Prikejeno po: Černe 1997.

Sestavine	[%]
Beljakovine	37–53
Maščobe	15–23
Ogljikovi hidrati	3–12
Vlaknine	4–8

Semena soje v povprečju vsebujejo 36 do 38 % proteinov in 19 % olj v suhi masi. Genetski in okoljski faktorji kot so kultivar, gojenje, rastni pogoji, predelava ter obdelava, močno vplivajo na sestavo semen (Luis et al. 2015). Sinteza proteinov v semenu naj bi bila pod velikim vplivom elementov v zemlji, kot so fosfor, kalij, dušik in žveplo. Pomanjkanje kalija lahko povzroči zmanjšanje sinteze proteinov in je prvi vzrok za zmanjšanje rasti. Rezultati Kaviani in Kharabian (2008) so pokazali, da različen nivo kalija in fosforja vpliva na količino založnih proteinov in njihove podenote. Najvišje vsebnosti bazičnih in kislih aminokislin ter tistih bogatih z žveplom, so bile opažene pri rastlinah gojenih v zemlji tretirani s 30 g in 15 g kalija ter 0,02 g fosforja. Optimalne koncentracije za povečanje proteinske vsebnosti v sojinih semenih so: 30 g kalija in 0,02 g fosforja na 100 kg zemlje (Kaviani and Kharabian 2008).

Sojina semena vsebujejo štiri skupine proteinov: založne proteine, encime in encimske inhibitorje vključene v metabolizem, strukturne proteine vključno s kromosomskimi in ribosomskimi ter membranske proteine. Približno 90 % založnih proteinov sojinih semen predstavljajo ne-vodotopni proteini – globulini (Kaviani and Kharabian 2008). Ti so razdeljeni v štiri kategorije (2S, 7S, 11S in 15S) glede na njihovo sedimentacijsko hitrost (Luis et al. 2015). Več kot 70 % globulinov predstavlja glicinin (11S globulin) in β -konglicinin (7S globulin). Glicinin, ki je shranjen v kličnih listih rastline v obliki proteinskih teles, je relativno bogat (3-4,5 %) z aminokislinami, ki vsebujejo žveplo (metionin, cistein). Za razliko od glicinina, ima β -konglicinin slabšo hranljivo vrednost, saj mu običajno primanjkuje aminokislin bogatih z žveplom. Izboljšavo hranilne vrednosti sojinih semen lahko dosežemo z zvišanjem razmerja med 11S in 7S globulini (Kaviani and Kharabian 2008).

4.2.1 Pridobivanje sojinih proteinov

Ločitev glicinina in β -konglicinina je pomembna tako za raziskovanje kemijske in fiziološke aktivnosti omenjenih podenot, kot tudi za uporabo v prehranski industriji. Ločitev lahko dosežemo na osnovi njune izoelektrične točke (glicinin pri pH 4,85, β -konglicininu pri pH 6,4). Za ekstrakcijo proteinov iz razmaščene sojine moke je možna uporaba pufra Tris-HCL z β -merkaptoetanolom, ki prekine disulfidne vezi, bazično okolje (pH 8) pa zagotovi, da se večina glicinina in β -konglicinina obori. Po odstranitvi netopnih snovi s centrifugiranjem, se pH supernatanta nastavi na 6,4 za obarjanje glicinina in nato še na pH 4,8 za oboritev β -konglicinina. Posamezne oborine se nato spere s tekočino pH vrednosti, pri kateri so očiščene frakcije topne. Supernatant¹⁰ je bogat z očiščenima glicininom in β -konglicininom. Po zaključku te osnovne metode se lahko uporabijo še druge metode, katerih namen je povečanje čistosti v pridelku (Luis et al. 2015).

Najpogostejša sojina pripravka na trgu sta sojin proteinski koncentrat (angl. Soy Protein Concentrate; SPC) in sojin proteinski izolat (angl. Soy Protein Isolate; SPI). Sestava semen, proteinskega koncentrata in izolata graha in soje, je predstavljena v Tabeli 22. Izolat vsebuje okoli 90 % proteinov in je običajno pridobljen z ekstrakcijo v alkalnih raztopinah, kateri sledi obarjanje v kislem, spiranje in sušenje. Glavni komponenti izolata sta glicinin (34 % vseh proteinov izolata) in β -konglicinin (27 % vseh proteinov izolata). Sojin proteinski koncentrat poleg sojinih proteinov vsebuje še ogljikove hidrate. Komercialen koncentrat je pridobljen z odstranitvijo sojine sirotke (topni ogljikovi hidrati) iz razmaščene sojine moke in vsebuje približno 80 % proteinov (Luis et al. 2015).

¹⁰ Supernatant je tekočina brez oborine, ki ostane nad trdnino.

Tabela 22: Primerjava sestave semen graha in soje ter koncentriranih beljakovinskih pripravkov iz njih v %.

Prirejeno po: Tömösközi et al. 2001.

Sestavina	Grah			Soja		
	Seme	Proteinski koncentrat	Proteinski izolat	Seme	Proteinski koncentrat	Proteinski izolat
Proteini	26,0	48,5	89,6	38,1	62,3	85,1
Lipidi	1,4	0,9	1,6	17,3	0,5	0,8
Vлага	13,0	8,6	5,3	8,5	4,5	3,9

4.3 GRAH KOT VIR KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV

Grah (*Pisum sativum*) je enoletna zelnata rastlina iz družine stročnic (Leguminosae ali Fabaceae), ki izvira iz Evrope in Azije. Vrsta *Pisum sativum* ne obstaja v divji obliki, predpostavlja se, da izvira iz vrste *Pisum elatius*. Grah za gojenje ni zahtevna rastlina, saj uspeva na različnih območjih zmerno tople in tudi hladnejše klime. Čas tehnološke zrelosti se določa s fizikalnimi, kemijskimi in morfološkimi metodami. Med prve spadajo meritve s tenderometrom, kjer merimo odpor zrna na pritisk in teksturometrom, ki meri odpor zrna proti prebadanju. Kemično zrelost določimo na podlagi analize škroba, sladkorja, v alkoholu neraztopljenih snovi in beljakovin. Morfološko zrelost pa z razmerjem med maso zrna in maso stroka (Černe 1997).

Suha grahova zrna vsebujejo 20 do 30 % proteinov, bogatih z lizinom (Swanson 1990), ki ga pri drugih rastlinskih virih, vključno z žitom, pogosto primanjkuje (Tömösközi et al. 2001). Za ekstrakcijo proteinov iz moke stročnic so bile razvite številne metode, ki se razlikujejo po ekstrakciji različnih vrst proteinov, kar vpliva na končno sestavo proteinskega produkta. Nekaj pogostih metod za pridobivanje proteinskih produktov so alkalna ekstrakcija, izoelektrično obarjanje, solno obarjanje z dializo in micelarno obarjanje (Stone et al. 2015).

Izoelektrično obarjanje rezultira v produktu sestavljenem predvsem iz globulinov, medtem ko dializa ekstrahira mešanico globulinov in albuminov. Produkt micelarne precipitacije oziroma

obarjanja je proteinski izolat v obliki micelov, ki so stabilizirani z vodikovimi vezmi. Tak izolat je lahko sestavljen tako iz globulinov, kot tudi albuminov, saj pri tej metodi proteini manj denaturirajo kot pri izoelektričnem obarjanju (Stone et al. 2015).

Za pripravo koncentrata je potrebno grahova semena zmleti, razmastiti s heksanom, obdelati s kislim etanolom in jih posušiti. Za pridobitev izolata pa je potrebno razmaščeno zmes nato ekstrahirati z NaOH in po centrifugiranju proteine oboriti s kislim pH (4,5) z uporabo HCl kisline. Oborino se spere ter liofilizira¹¹ (angl. freeze drying). Produkt vsebuje med 70 in 80 % proteinov (Tömösközi et al. 2001).

4.3.1 Alkalna ekstrakcija in izoelektrično obarjanje

Razmaščeno grahovo moko najprej razpršijo v vodi, ki ji nastavijo pH na 9.5 z uporabo NaOH. Slednja zmes se na mešalu meša 1 uro pri sobni temperaturi. Sledi 20 minutno centrifugiranje na 4 °C. Supernatant nato zberejo in mu pH z uporabo HCl nastavijo na 4,5, čemur ponovno sledi centrifugiranje (20 min, 4 °C). Pelét hranijo na -30 °C do liofilizacije (Stone et al. 2015).

4.3.2 Dializa

Obarjanje s soljo je metoda, pri kateri znižujemo topnost proteinov v vodi z uporabo soli, ki so v vodi bolj topne (npr. amonijev sulfat). Ker se posamezni proteini obarijo pri specifični koncentraciji soli, lahko s to metodo ločimo posamezne proteine v zmesi (Lee 2017). Pri omenjeni metodi razmaščeno grahovo moko zmešajo s pufrom in 6.4 % KCl v razmerju 1:10. Mešanica je na mešalu 24 ur pri sobni temperaturi. Naslednji korak je 20 minutno centrifugiranje na 4 °C. Supernatant zberejo in ga dializirajo z ultra čisto vodo pri 4 °C. Vodo menjajo trikrat dnevno, naslednjih 72 ur. Po dializi ekstrakt shranijo na -30 °C do liofilizacije (Stone et al. 2015).

¹¹ Proces, pri katerem z nizko temperaturo povzročimo dehidracijo produkta in nato z nižanjem pritiska s sublimacijo odstranimo ledene kristale (Termania 2019).

4.3.3 Micelarno obarjanje

Razmaščena grahova moka je raztopljena v NaCl raztopini v razmerju 1:10. Sledi mešanje na mešalu (2 uri, sobna temperatura) in centrifugacija (20 min, 4 °C). Nato supernatant zberejo in ga desetkratno redčijo v deionizirani vodi (4°C) in ga pustijo na 4 °C za 18 ur. Pelét shranijo na -30 °C do liofilizacije produkta (Stone et al. 2015).

Proteinska vsebnost izolatov pridobljenih z omenjenimi metodami se giba med 71,5 % (solna ekstrakcija) in ~87,8 % (micelarno obarjanje). Proteinski izolat pridobljen s solno ekstrakcijo ima torej manjšo vsebnost proteinov, kot tisti pridobljen z alkalno ekstrakcijo (83,3–86,9 %) in micelarnim obarjanjem (81,9–87,8 %) (Stone et al. 2015).

4.4 KONOPLJA KOT VIR KONCENTRIRANIH BELJAKOVINSKIH PRIPRAVKOV

Semena konoplje (lat. *Cannabis sativa*) poleg znatne vsebnosti prehranskih vlaknin vsebujejo približno 30 % olj in 25 % proteinov. Slednje predstavljata edestin in albumin, ki sta lahko prebavljiva in bogata z esencialnimi aminokislinami. Detektirana in identificirana sta bili celo aminokislini metionin in cistein (Tang et al. 2006).

Konopljino olje v 80 % sestavlja nenasičene maščobne kisline, ki so bogat vir omega-6 in omega-3 esencialnih maščobnih kislin (Tang et al. 2006). Stranski produkt priprave jedilnega konopljinega olja je pogača (ang. Hemp Meal; HPM), ki naj bi imela hrnilno vrednost podobno ostalim virom proteinov. HPM je lahko nadaljnje prečiščen z alkalno ekstrakcijo, ki ji sledi izoelektrično obarjanje za pridobitev konopljinega proteinskega izolata (ang. Hemp Protein Isolate; HPI). Rezultati Maloma in Aluko (2015) so pokazali, da proces izolacije proteinov, ne povzroči večjih sprememb v vsebnosti aminokislin. Viden je rahel dvig vsebnosti arginina pri HPI (15,06 %), v primerjavi z HPM (13,20 %) ter razmerja arginina in lizina, ki je pri HPI večje.

4.4.1 Izoelektrično obarjanje

Priprava HPI poteka podobno kot priprava sojinega, le z nekaj modifikacijami. Razmaščeno pogačo zmešajo z deionizirano vodo pri 35 °C in pH mešanice nastavijo na pH 10.0, s pomočjo NaOH. Po približno eni uri ekstrakcije na mešalu, mešanico centrifugirajo 30 minut na 20 °C. Pelét je odstranjen, supenatantu pa z dodajanjem HCl pH nastavijo na vrednost 5.0. Nastali precipitat zberejo s centrifugiranjem (10 min). Izoelektrično oborino ponovno suspendirajo v deionizirani vodi in po homogenizaciji suspenzije pH nastavijo na 6.8 s pomočjo NaOH. Takšno suspenzijo zamrznejo in osušijo, da nastane konopljin proteinski izolat (Tang et al. 2006).

Tabela 23: Primerjava sestave konopljine in sojine pogače ter HPI in SPI. Pridelano po: Tang et al. 2006.

Vzorec	Proteini (%)	Vлага (%)	Ash (%)	Ostalo (%)
Konopljina pogača	50,2	6,7	3,2	39,9
Sojina pogača	43,3	8,0	3,3	45,4
HPI (Hemp Protein Isolate)	86,9	3,9	2,6	6,6
SPI (Soy Protein Isolate)	89,0	5,0	2,3	3,7

Kemijska sestava konopljinega proteinskega izolata je podobna sestavi sojinega izolata, z izjemo vlage, ki je pri sojinem višja, kar lahko razberemo iz Tabele 23. Slednje je lahko posledica sposobnosti zadrževanja vode, ki se med proteini razlikuje (Tang et al. 2006).

Približno 82 % vseh proteinov v konopljinem izolatu sestavlja protein edestin. Po tem se razlikuje od sojinega proteinskega izolata, v katerem sta pretežno prisotna glicinin (legumin) in β-konglicinin (vicilin), ki se pojavljata v približno enakem razmerju. Na podlagi omenjenega je pričakovano, da se lastnosti proteinskega izolata konoplje razlikujejo od tistih značilnih za sojin proteinski izolat (Tang et al. 2006).

V Tabeli 24 je primerjava aminokislinske sestave konopljinega in sojinega izolata s sestavo konopljinega proteinskega izolata. Konopljin proteinski izolat ima podobne ali višje vrednosti nekaterih aminokislin, in sicer: asparaginska kislina, glutaminska kislina, serin, arginin, levcin, fenialanin in lizin. V primerjavi s sojnim proteinskih izolatom, ima konopljin višjo vsebnost arginina, metionina in cisteina ter nižjo vsebnost asparaginske in glutaminske kisline ter lizina.

Vsebnost ostalih aminokislin je podobna. Višja vsebnost metionina in cisteina v konopljinem izolatu je povezana s prisotnostjo proteinov, v konopljinem semenu, bogatih z metioninom in cisteinov. V primerjavi s kazeinom, ima HPI večinoma višje vrednosti aminokislin na gram proteinov, z izjemo tirozina, valina, levcina, metionina in lizina (Tang et al. 2006).

Tabela 24: Primerjava aminokislinske sestave konopljinega izolata, sojinega izolata in kazeina. Pridelano po Tang et al. 2006.

Aminokislina (mg/g proteina)	Vir proteinov		
	Konopljin proteinski izolat	Sojin proteinski izolat	Kazein
Asparaginska kislina	98,0	118,1	63
Glutaminska kislina	168,1	212,9	190
Serin	54,0	54,8	46
Glicin	41,7	38,6	16
Histidin	29,3	29,0	27
Arginin	103,2	75,7	33
Treonin	47,6	41,0	37
Alanin	47,0	38,3	27
Prolin	47,2	52,9	
Tirozin	38,2	37,1	55
Valin	51,8	44,1	60
Izolevcin	41,5	44,8	49
Levcin	69,0	70,0	84
Metionin	14,5	9,3	26
Cistein	1,7	0,6	0,4
Fenialanin	49,6	53,0	45
Lizin	43,3	53,9	71

Podatki sestave HPI, predstavljeni v Tabeli 24, kažejo na dober profil esencialnih aminokislin, ki je podoben aminokislinskemu profilu kazeina in SPI, v nekaterih primerih ima HPI celo višjo vsebnost kot SPI (Tang et al. 2006).

5 ZAKLJUČEK

Prehranska dopolnila kot tudi druga živila lahko vsebujejo različne koncentrirane beljakovinske pripravke, ki se močno razlikujejo po svoji sestavi in lastnostih. Zato kakovostni izdelki, poleg uporabljenega vira – npr. sladka sirotka ali grah, navajajo tudi metodo priprave.

Zaradi podnebnih sprememb je vedno pomembnejše, da razvijamo in uporabljamo trajnostne pristope v proizvodnji, še posebej, ko gre za hrano. Tudi neenakomerna prehranjenost ljudi po svetu je gotovo razlog, da ustvarimo čim manj ali, še bolje, nič odpadkov v živilski industriji. Že zato bi nas moralo zanimati, kaj se na primer dogaja z vso sirotko naših mlekarjev. Obenem pa je to lahko poslovna priložnost, da tradicionalni živilci vstopijo v proizvodnjo prehranskih dopolnil kot dobavitelji surovin. Posledice razvoja znanj na tem področju bomo zato lahko videli šele v prihodnosti, gotovo pa lahko pripomore k pozitivnejšemu pogledu na kategorijo prehranskih dopolnil, ki kot glavno sestavino vsebujejo koncentrirane beljakovinske pripravke.

6 VIRI IN LITERATURA

1. Černe M (1997) Stročnice. Kmečki glas, Ljubljana
2. Chalamaiah M, Dinesh B, Hemalatha R, Jyothirmayi T (2012) Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications : A review. *Food Chem* 135:3020–3038
3. De Wit JN (1998) Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of dairy science* 81(3): 597-608
4. Dekkers E, Raghavan S, Kristinsson HG, Marshall MR (2011) Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. *Food Chem* 124:640–645
5. Derbyshire E, Wright D, Boulter D (1976) Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* 15 (1):3-24
6. Dervišević E, Vidmar J (2009) Vodič športne prehrane. Fakulteta za šport, Ljubljana
7. European Food Safety Agency [EFSA] (2012) Scientific Opinion on Dietary Reference Values for protein. EFSA Journal 10(2). <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2012.2557> Accessed 16 August 2019
8. Fernández-Quintela A, Macarulla M, Del Barrio A, Martínez J (1997) Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods for Human Nutrition* 51 (4):331-341
9. Fox PF (2003) Milk proteins: General and historical aspect. *Advanced Dairy Chemistry — 1 Proteins*. Springer, Bost MA 1:1–48
10. Hammershøj M, Peters L V, Andersen HJ (2004) The significance of critical processing steps in the production of dried egg albumen powder on gel textural and foaming properties. *J Sci Food Agric* 48:1039–1048
11. Hoyle NT, Merritt JH (1994) Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *J Food Sci* 59:76–79
12. Hubbard TJP, Ailey B, Brenner SE, et al (1999) SCOP: A structural classification of proteins database. *Nucleic Acids Res*. 27:254–256

13. Kaviani B, Kharabian A (2008) Improvement of the Nutritional Value of Soybean [Glycine max (L) Merr.] Seed with Alteration in Protein Subunits of Glycinin (11S Globulin) and\beta-conglycinin (7S Globulin). *Turkish Journal of Biology* 32 (2):91-97
14. Kodele M, Suwa - Stanojević M, Gliha M (1997) *Prehrana*. DZS, Ljubljana
15. Koshland ED, Haurowitz F (2019) Protein. V: Encycl. Br. <https://www.britannica.com/science/protein>. Accessed 3 April 2019
16. Kosikowski F (1979) Whey Utilization and Whey Products I. *J Dairy Sci* 62:1149–1160
17. Kovacs-Nolan J, Phillips M, Mine Y (2005) Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health. *J Agric Food Chem* 53:8421–8431
18. Kristinsson HG, Rasco BA (2000) Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical reviews in food science and nutrition* 40(1): 43-81
19. Layman DK, Rodriguez NR (2009) Egg protein as a source of power, strength, and energy. *Nutrition Today* 44(1): 43-48.
20. Lechevalier V, Jeantet R, Arhaliass A, et al (2007) Egg white drying : Influence of industrial processing steps on. *J Food Eng* 83:404–413
21. Lee C-H (2017) A Simple Outline of Methods for Protein Isolation and Purification. *Endocrinology and Metabolism* 32 (1):18-22
22. Lipovšek S (2013) Moč prehrane v športu : kako s prehrano in prehranskimi dopolnilni doseči svoj največji potencial in zmogljivost. Samala, Ljubljana
23. Luis M, Vermont PD, De Mejía EG (2015) Soy Proteins. *Appl Food Protein Chem* 139–191
24. Malomo SA, Aluko RE (2015) A comparative study of the structural and functional properties of isolated hemp seed (*Cannabis sativa L.*) albumin and globulin fractions. *Food Hydrocolloids* 43:743-752
25. Mine Y (1995) Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends Food Sci Technol* 6:225–232
26. Mine Y (2002). Recent advances in egg protein functionality in the food system. *World's poultry science journal* 58(1): 31-9
27. Nacionalni inštitut za javno zdravje [NIJZ] (2019) Z zdravo prehrano in gibanjem do zdravja. <http://www.fao.org/3/a-az912o.pdf>. Accessed 16 August 2019

28. Nehete JY, Bhambhani RS, Narkhede MR, Gawali SR (2013) Natural proteins: Sources, isolation, characterization and applications. *Pharmacogn Rev* 7 (14):107-116
29. Onwulata C, Huth P (2009) Whey Processing, Functionality and Health Benefits. John Wiley & Sons
30. Owusu-Apenten R (2005) Introduction to food chemistry. CRC Press, United States of America
31. Oxford Reference (2019) Isoelectric precipitation. Dostopno prek: <https://www.oxfordreference.com/view/10.1093/oi/authority.20110803100012784>. Accessed 16 August 2019
32. P3 Professional (2019) http://www.covirias.si/primerjava_laiki/primerjava.php. Accessed 16 August 2019
33. Pesta G, Meyer-Pittroff R, Russ W (2007) "Utilization of whey." Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry. Springer, Boston MA
34. Schlieper C, Gregori E, Lindner G (1997) Pravilna prehrana - Hranoslovje. Mohorjeva založba, Ljubljana
35. Siso MG (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource technology* 57(1): 1-11.
36. Stone AK, Karalash A, Tyler RT, Warkentin TD, Nickerson MT (2015) Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food research international* 76:31-38
37. Suwa Stanojević M (2010) Prehrana in zdravje. Ljubljana: Zavod IRC. http://www.mizs.gov.si/fileadmin/mizs.gov.si/pageuploads/podrocje/vs/Gradiva_ES_S/Impletum/IMPLETUM_365ZIVILSTVO_Prehrana_Suwa.pdf. Accessed 16 August 2019
38. Swanson BG (1990) Pea and lentil protein extraction and functionality. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 67 (5):276-280
39. Tang CH, Ten Z, Wang XS, Yang XQ (2006) Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa L.*) protein isolate. *J Agric Food Chem* 54 (23):8945-8950
40. Termania (2019) Liofilizacija. <https://www.termania.net/slovarji/slovenski-oblikoslovni-leksikon-sloleks/5614293/liofilizacija?query=liofilizacija&SearchIn=All>. Accessed 16 August 2019

41. Tömösközi S, Lasztity R, Haraszi R, Baticz O (2001) Isolation and study of the functional properties of pea proteins. Food/Nahrung 45 (6):399-401
42. ZRC SAZU, Inštituta za slovenski jezik Frana Ramovša (2018) Termania: Izsoljevanje (obarjanje s soljo). <http://www.fran.si>. Accessed 13. May 2019
43. ZRC SAZU, Inštituta za slovenski jezik Frana Ramovša (2018) Termania: Proteaza. <http://www.fran.si>. Accessed 13. May 2019