

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**PROTEOM KOKOSOVOG MLIJEKA**

**THE PROTEOME OF COCONUT MILK**

**SEMINARSKI RAD**

Silvija Lihtar

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: izv.prof.dr.sc. Biljana Balen

Zagreb, 2015.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. KOKOSOVA PALMA ( <i>Cocos nucifera</i> L.).....	2
3. DOBIVANJE KOKOSOVOG MLIJEKA.....	3
4. PRIMJENA KOKOSOVOG MLIJEKA.....	3
5. ISTRAŽIVANJE PROTEOMA KOKOSOVOG MLIJEKA.....	4
5.1. METODE ISTRAŽIVANJA.....	4
5.2. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	5
5.3. RASPRAVA DOBIVENIH REZULTATA.....	9
6. ZAKLJUČAK.....	11
7. LITERATURA.....	12
8. SAŽETAK.....	13
9. SUMMARY.....	14

# 1. UVOD

U ovom seminarskom radu napisat ću nešto općenito o kokosovom mlijeku, njegovim svojstvima, dobivanju i upotrebi, te nešto o biljci iz koje se ono dobiva – *Cocos nucifera L.* Detaljnije ću obraditi tematiku proteoma kokosova mlijeka, odnosno iznijet ću tijek i rezultate istraživanja provedenog 2011. godine u Milanu na kemijskom zavodu Fakulteta materijala i kemijskog inženjerstva.

Obzirom na široku primjenu kokosovog mlijeka u ljudskoj prehrani diljem svijeta, te na njegove potencijalne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, iznenađujuće je da već mnogo ranije nisu provedena opsežna istraživanja proteina kokosa i njegova kompletnog proteoma. Proteom je skup svih proteina nekog organizma, a njegovim proučavanjem bavi se proteomika. Ranije objavljena istraživanja obuhvaćaju pročišćivanje i karakterizaciju glavnih proteina prisutnih u kokosu korištenjem klasičnih biokemijskih metoda i shema za pročišćivanje (Kwon i sur. 1996., Garcia i sur. 2005.), fokusiraju se na učinke obrade na nutritivnu vrijednost proteina kokosa (Mepba i Achinewhu 2003.) ili na hipolipidemične i anti-peroksidativne učinke spomenutih proteina u hiperkolesterolemičnim štakorima (Salil i Rajamohan 2001.). Također, ranije je objavljen test ELISA za detekciju i kvantifikaciju proteina kokosovog mlijeka u obrađenoj hrani (Surojanametakul i sur. 2011.). No, tek u ovom istraživanju proteom kokosovog mlijeka bio je opsežno mapiran primjenom tehnologije datoteka rekombiniranih peptidnih liganda (*combinatorial peptide ligand libraries*, CPLL) analizom pri tri vrijednosti pH. To je daleko najopsežnije mapiranje proteoma kokosova mlijeka provedeno do sada, obzirom da je ranije bio identificiran samo manji broj proteina, i to onih koji su visoko zastupljeni, a nakon tretmana CPLL ukupan se broj identificiranih proteina i više nego udvostručio.

## 2. KOKOSOVA PALMA (*Cocos nucifera* L.)

Kokosova palma je drvenasta biljka iz porodice palmi (*Areaceae*). Rasprostranjena je u tropskim područjima, osobito na obalama i otocima Tihog i Indijskog oceana. Biljka ima tanko deblo, promjera oko 30 cm, koje je veoma čvrsto te naraste do visine 20 - 30 metara. Ima glatku sivu koru sa ožiljcima od otpalih listova. Korijen je opsežno razgranjen, ogranci su dugi do 8 metara kako bi biljka bila dobro učvršćena u pješčanom tlu. Perasto razdijeljeni listovi dugi do 4 metra čine gustu krošnju na vrhu stabla ([hr.wikipedia.org](http://hr.wikipedia.org)). Cvatovi na bazi listova obavijeni su spatom i sastavljeni su od zasebnih ženskih i muških cvjetova. Opisani habitus prikazan je na Slici 1. Biljka može živjeti i davati plodove oko 100 godina ([www.ntbg.org](http://www.ntbg.org)). Plod je neobična jednosjemena koštunica sa tankim, glatkim egzokarpom koji osigurava hidroizolaciju, vlaknatim i debelim mezokarpom koji osigurava mogućnost dugog plutanja na vodi, te izrazito tvrdim endokarpom koji štiti embrij. Unutar endokarpa nalazi se endosperm u dva agregatna stanja – izvana je to čvrsti endokarp bogat uljem, a iznutra je tekuć i naziva se „kokosova voda“ (Nikolić 2013.). Iz tog čvrstog mesnatog endosperma dobiva se kokosovo mlijeko. Na Slici 1. prikazana je građa ploda, a dio iz kojeg se dobiva kokosovo mlijeko bijele je boje. Ovakva građa sjemenke omogućava dugotrajno plutanje na vodi i pogodna je za rasprostranjivanje na velike udaljenosti. Gotovo svi dijelovi biljke mogu se iskoristiti. Iz ploda možemo dobiti kokosovo brašno, kokosovo mlijeko, kokosovu vodu i kokosovo ulje, koji imaju široku primjenu u prehrani te u kemijskoj industriji. Ostali dijelovi biljke, lišće i debla, koriste se kao građevni materijal, dok se iz kore dobiva guma ([hr.wikipedia.org](http://hr.wikipedia.org)).



**Slika 1.** – Izgled biljke *Cocos nucifera* L. i građa kokosovog oraha  
([hr.wikipedia.org/wiki/Kokosova\\_palma](http://hr.wikipedia.org/wiki/Kokosova_palma))

### **3. DOBIVANJE KOKOSOVOG MLIJEKA**

Kokosovo mlijeko je slatka, mliječno bijela tekućina, dobivena iz „mesa“ zrelog kokosa, odnosno iz krutog dijela endosperma koji se nalazi unutar endokarpa. Može se lako pripremiti kod kuće na način da se kokosovo „meso“ sitno nariba i namače u vrućoj vodi. Natopljeni komadići se potom procijede kroz gustu gazu i dobije se tekućina koja se naziva kokosovo mlijeko. Boja i bogat okus tog mlijeka mogu se pripisati visokom udjelu masti. Udio masti u tako dobivenom mlijeku je 17 - 24%. Proces se može ponoviti nekoliko puta kako bi se dobilo laganije mlijeko sa smanjenim udjelom masti, kakvo je potrebno za neke recepte. Ono se također može kupiti u trgovini u konzerviranom obliku.

### **4. PRIMJENA KOKOSOVOG MLIJEKA**

Kokosovo mlijeko bogato je vitaminima, mineralima i dobrim mastima te stoga ima veoma široku primjenu. Česta je namirnica u mnogim tropskim kuhinjama, osobito u jugoistočnoj Aziji (Burma, Kambodža, Filipini, Indonezija, Malezija, Singapur, Tajvan), ali također u Brazilu, na Karibima, Filipinima, u Polineziji, Indiji i Šri Lanki. Najčešće se koristi u pripremi umaka, juha, variva te deserata. Na zapadu se uglavnom koristi kao napitak, ili svježe kao bezalkoholni napitak ili fermentirano u alkoholnim pićima. Također se koristi u veganskoj kuhinji kao zamjena za kravlje mlijeko kod kuhanja, te se od njega dobivaju zamjene za uobičajene mliječne proizvode. Kako ne sadrži laktozu odlična je alternativa za osobe koje zbog intolerancije ne mogu konzumirati kravlje mlijeko. Ono ima mnoge povoljne utjecaje na ljudsko zdravlje jer sadrži vlakna, vitamine C, E, B1, B3, B5, B6, te željezo, selenij, natrij, kalcij, magnezij i fosfor. Zbog toga se smatra dobrim za jačanje kostiju i kose te za hidrataciju kože pa ima primjenu i u kozmetičkoj industriji. Glavna zasićena masna kiselina koju sadrži je laurinska kiselina, koja se u značajnim količinama nalazi i u majčinu mlijeku i u sekretu lojnih žlijezda. Pokazalo se da ona potiče razvoj mozga i zdravlje kostiju, te se lako metabolizira u tijelu. Zbog njenog visokog sadržaja, kokosovo mlijeko uravnotežava povećanu razinu „lošeg“ kolesterola u tijelu, te ima antivirusno i antibakterijsko djelovanje u probavnom traktu, kao i sposobnost liječenja čireva u ustima ([www.bbcgoodfood.com](http://www.bbcgoodfood.com), [en.wikipedia.org/wiki/Coconut\\_milk](http://en.wikipedia.org/wiki/Coconut_milk)).

## 5. ISTRAŽIVANJE PROTEOMA KOKOSOVOG MLIJEKA

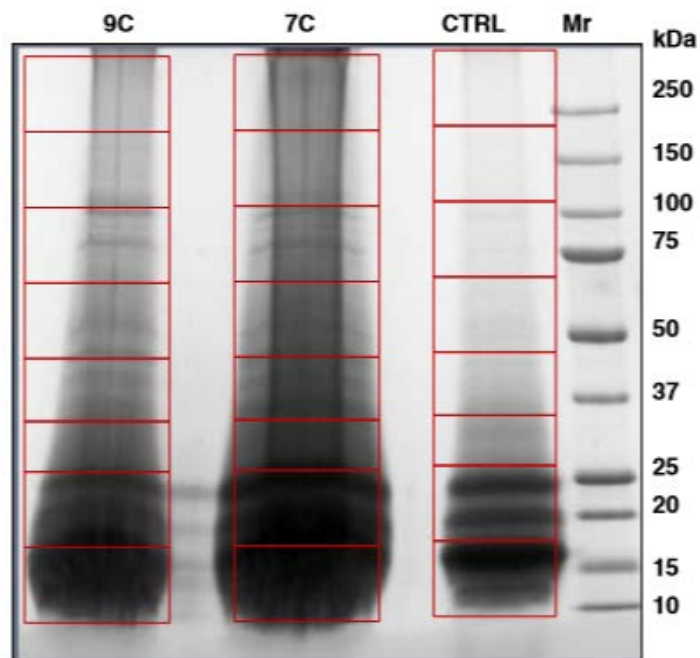
Najveći problem u biljnoj proteomici je nedostatak podataka o proteinima većine biljnih vrsta, pa tako i kokosa. Obzirom na široku primjenu kokosovog mlijeka i potencijalne povoljne učinke na ljudsko zdravlje, znanstvenici sa kemijskog zavoda na Fakultetu materijala i kemijskog inženjerstva u Milanu odlučili su istražiti kompletni proteom kokosovog mlijeka u najvećoj mogućoj mjeri primjenom metode CPLL. Ta je tehnologija nedavno razvijena i pokazalo se kako daje jedinstvene rezultate u pojačavanju signala proteina niske zastupljenosti u kompleksnim proteomima. Proteom je bio opsežno mapiran analizom pri tri vrijednosti pH primjenom metode CPLL. Ukupno je identificirano 307 jedinstvenih genskih produkata: 170 ih je otkriveno primjenom metode CPLL na tri vrijednosti pH, 107 je pronađeno u kontroli, odnosno netretiranom uzorku kokosovog mlijeka, a 30 proteina je bilo zajedničko u oba seta podataka.

### 5.1. METODE ISTRAŽIVANJA

Sadržaj limenke kokosovog mlijeka kupljene u trgovini titriran je pri dvije različite vrijednosti pH (7,0 i 9,3). U oba uzorka dodani su laboratorijski pripremljena zrnca CPLL (*home-made-CPLL*, HM-CPLL) i zrnca ProteoMiner (komercijalno dostupna zrnca CPLL). Apsorpcija proteina provedena je laganim potresanjem kroz tri sata na sobnoj temperaturi, a potom su zrnca prikupljena filtracijom i isprana dva puta odgovarajućim puferima. Proteini vezani na zrnca potom su isprani iz svakog uzorka. Nevezani dio (*flowthrough*) kokosovog mlijeka titriran je pri pH 2,2 i potom tretiran sa HM-CPLL kako bi se otkrili dodatni proteini koji možda nedostaju u prethodna dva uzorka. Nakon tih postupaka provedeno je razdvajanje eluata sa svih zrnaca natrijev-dodecil sulfat – poliakrilamidnom gel elektroforezom (SDS-PAGE). Proteini u gelu su vizualizirani bojom Colloidal Coomassie Blue i potom je gel snimljen. Pojedine vrpce iz svakog uzorka izrezane su na 7 do 9 pravokutnih dijelova, što je prikazano na Slici 2. i Slici 3. Proteini iz svakog od izrezanih uzoraka tretirani su tripsinom i analizirani tekućinskom kromatografijom spregnutom sa tandemnom spektrometrijom masa, (*nano-liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, nano-LC-MS/MS).

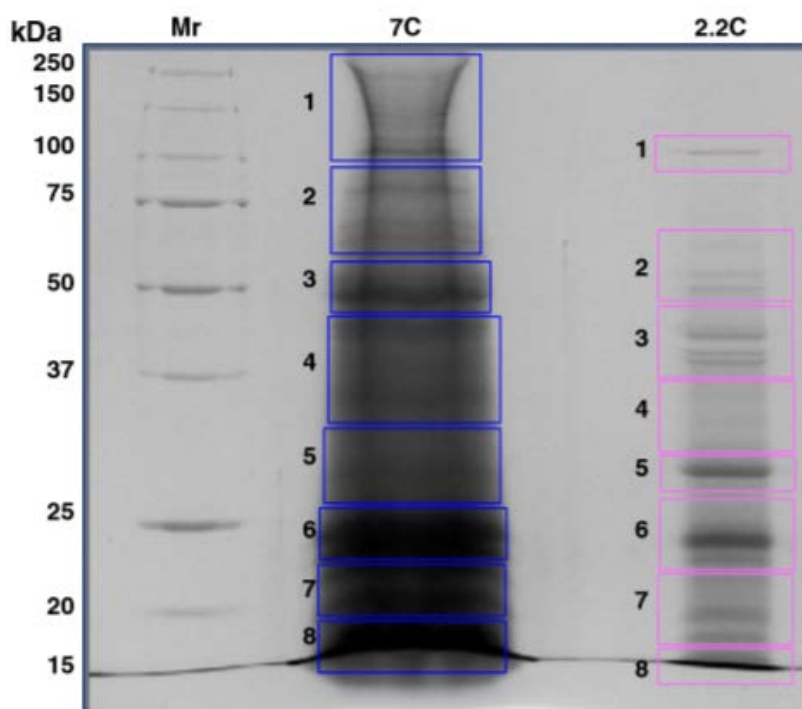
## 5.2. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Slika 2. prikazuje rezultate razdvajanja proteina tehnikom SDS-PAGE iz kontrole, odnosno netretiranog kokosovog mlijeka, i iz dva eluata sa zrnaca CPLL nakon tretmana pri pH 9,3 i pri pH 7,0. Može se uočiti kako je većina vidljivih vrpca u kontroli koncentrirana u području molekulskih masa ( $M_r$ ) od 10 – 25 kDa, a proteini većih molekulskih masa prisutni su samo u tragovima. Denziometrijom, odnosno mjerenjem gustoće, moglo bi se procijeniti da četiri vrpce u području niske  $M_r$  predstavljaju 95% ukupnih proteina u kokosovom mlijeku. Nasuprot tome, u dva eluata dobivena pri pH 9,3 i 7,0 vidljiv je gotovo beskonačan broj vrpca koje se protežu u području  $M_r$  25 – 250 kDa.



**Slika 2.** Rezultati razdvajanja proteina kokosovog mlijeka tehnikom SDS-PAGE. Uzorci, s lijeva na desno: eluat CPLL nakon tretiranja na pH 9,3 (9C); eluat CPLL nakon tretiranja na pH 7,0 (7C); kontrola, netretirano kokosovo mlijeko (CTRL); biljeg molekulskih masa ( $M_r$ ). Proteini su vizualizirani koloidnom bojom Commasie Brilliant Blue. Pravokutnici pokazuju kako je gel izrezan za analizu masenom spektrometrijom.

Na Slici 3. uočava se da eluat pri pH 7,0 sadrži veliku količinu proteina niskih Mr, dok je eluat nakon tretiranja na pH 2,2 uvelike normalizirao relativnu koncentraciju različitih proteina i prikazuje niz veoma jasnih i dobro odijeljenih vrpce koje se pružaju do područja Mr od 100 kDa.

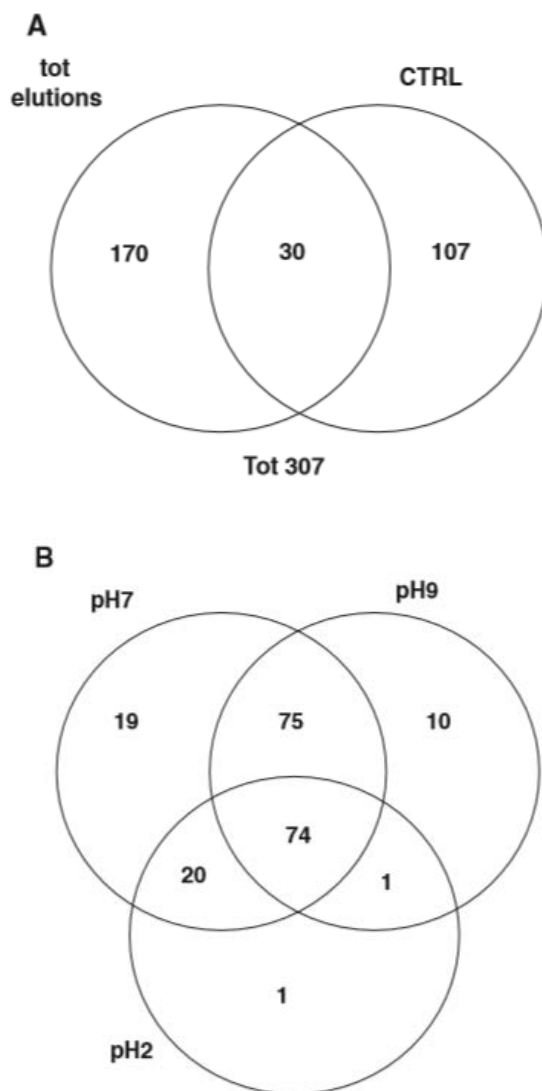


**Slika 3.** Rezultati razdvajanja proteina kokosovog mlijeka tehnikom SDS-PAGE. Uzorci, s lijeva na desno: biljeg molekulske mase (Mr); eluat HM - CPLL nakon tretiranja na pH 7,0 (7C); eluat HM - CPLL nakon tretiranja na pH 2,2 (2,2C). Proteini su vizualizirani koloidnom bojom Commasie Brilliant Blue. Pravokutnici pokazuju kako je gel izrezan za analizu masenom spektrometrijom.

Nakon što su vrpce izrezane u dijelove, tretirane su tripsinom i analizirane tehnikom nano-LC-MS/MS, te su dobiveni konačni rezultati ove opsežne analize. Ukupno je identificirano 307 jedinstvenih genskih produkata: 170 ih je otkriveno nakon hvatanja proteina na zrnca CPLL pri tri vrijednosti pH, 107 je pronađeno u kontroli, odnosno netretiranom materijalu, a 30 proteina je bilo zajedničko u oba seta podataka. Ti su rezultati prikazani Vennovim dijagramom na Slici 4.a.

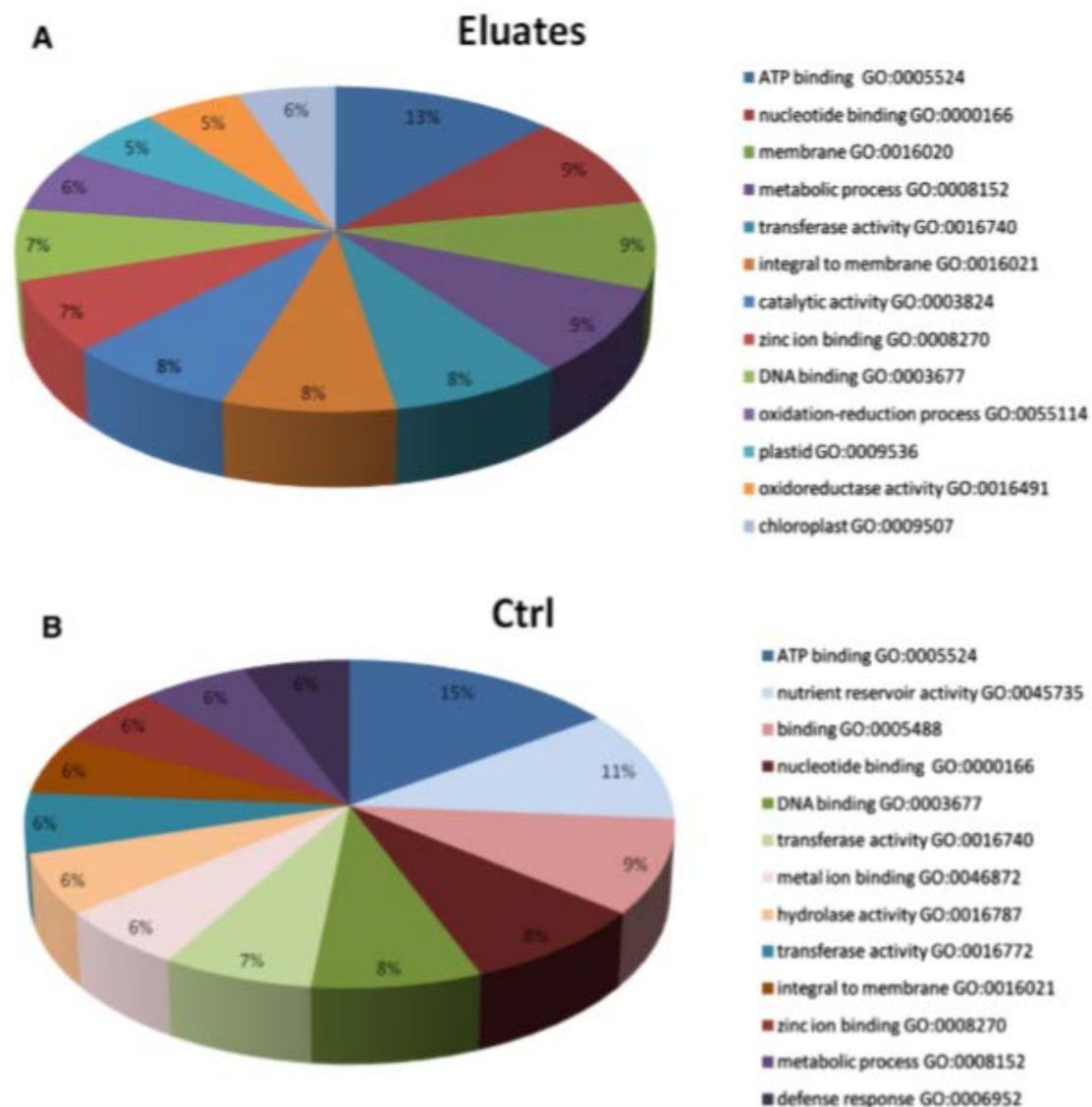


Na Slici 4.b. vidljiv je doprinos otkriću proteina svakog od tri eluata (pH 2,2, pH 7,0 i pH 9,3). Eluati tretirani na pH 7,0 i 9,3 doprinijeli su sa 19, odnosno 10 jedinstvenih proteina, a doprinos eluata tretiranog na pH 2,2 je samo jedan jedinstveni protein.



**Slika 4. a** - Vennov dijagram koji prikazuje ukupan broj identificiranih proteina u kokosovom mlijeku. Od ukupnih 307 proteina, 170 ih je nađeno u različitim eluatima iz CPLL zrnaca, 107 samo u kontroli, a 30 ih je zajedničko u oba seta podataka. **b** – Vennov dijagram koji prikazuje doprinos otkriću proteina svakog od 3 eluata: pH 2,2, pH 7,0 i pH 9,3.

Slika 5. prikazuje rezultate analize ontologije gena (*gene ontology*, GO), odnosno glavne puteve u koje su različiti proteini uključeni. Slika 5.a odnosi se na sve eluate iz CPLL-a, dok se Slika 5.b odnosi na kontrolni uzorak. Primjećuje se kako je od 13 navedenih kategorija samo 5 zajedničkih u oba seta podataka. Oba seta su bogata proteinima u ATP-vezujućem sektoru. Proteini eluirani sa zrnaca uglavnom su membranski proteini i proteini uključeni su u vezujuće, transferazne i metaboličke aktivnosti.



**Slika 5.** Prikaz rezultata analize ontologije gena istraženog proteoma. **a** – Klasifikacija ontologije gena svih eluata (200 proteina). **b** – Klasifikacija ontologije gena kontrole, netretiranog materijala (146 proteina).

### 5.3. RASPRAVA DOBIVENIH REZULTATA

Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako je tretman primjenom tehnologije CPLL više nego udvostručio ukupan broj poznatih proteina u kokosovom mlijeku. Neočekivani rezultat u istraživanju je činjenica da je od ukupno 307 detektiranih proteina tretman CPLL propustio više od 30% ukupnog proteoma. Takav rezultat nije u skladu sa podacima koji su uslijedili kasnije, u kojima je gubitak tijekom vezanja proteina na zrnca CPLL reduciran na manje od 5%, osobito kada se izvodi tretman na tri ili četiri vrijednosti pH. Moguće je ukazati jedino na to da matriks u kojem su otopljeni proteini kokosa nepovoljno utječe na tretman zncima CPLL. To je zapravo činjenica tipična za istraživanje biljnih proteoma, gdje je dobro poznato da su sekundarni metaboliti (npr. polifenoli i polisaharidi) prisutni u nezanemarivim količinama i da ometaju bilo koju metodu obrade proteina, pa bi njihova prisutnost mogla biti odgovorna za neuspjeh primjene tretmana CPLL.

Baza podataka za kokos od ranije je sadržavala 123 proteina, a 6 od tih je navedeno u rezultatima ovog istraživanja. To znači da je većina otkrivenih proteina identificirana samo na temelju homologije sa sekvencama pohranjenim u glavnoj biljnoj bazi podataka. Sličan slučaj dogodio se u ranijem istraživanju proteoma bademova mlijeka; od 132 identificirana proteina samo je 30 pripadalo rodu *Prunus*, a velika većina mogla se identificirati jedino homologijom sa proteinima iz glavne biljne baze podataka, posebno onima iz vrsta *Oryza sativa*, *Vitis unifera*, *Triticum aestivum*, *Arabidopsis thaliana* itd (Fasoli i sur. 2011.). Dakle, iako se biljna proteomika brzo razvija, za daljnji napredak potrebno je sekvencirati što više različitih biljnih genoma jer se većina dosad objavljenih radova bavi proteomima biljnih vrsta *Arabidopsis thaliana* i *Oryza sativa*.

Najbrojniji među identificiranim proteinima su glutelin i 7S globulin. 7S globulin je spremišni protein prisutan uglavnom u svim sjemenkama. Ima teorijsku Mr od 67008 Da, a pronađen je kao jedna od tri najveće vrpce koja se nalazi u području Mr od 15 – 25 kDa na prikazu rezultata dobivenih razdvajanjem proteina SDS-PAG elektroforezom (Slika 2). To znači da ovaj protein nije ostao u cijelosti sačuvan, već je izrezan na fragmente jednake veličine tijekom homogenizacije kokosovog mesa ili tijekom industrijske obrade uslijed aktivnosti proteaza. Isto se zbilo i glutelinu, drugom visoko zastupljenom proteinu pronađenom u kokosovom mlijeku, koji ima teorijsku Mr od 42811 Da, ali je također nađen i u području Mr od 15 – 25 kDa. Ovakav slučaj dogodio se i kod prunina koji je glavni spremišni globulin u bademu. Njegova molekulska masa iznosi 63321 Da i to je najveći

protein pronađen u bademovom mlijeku. Na gelu dobivenom razdvajanjem proteina tehnikom SDS-PAGE nije detektiran u području koje odgovara netaknutoj molekulskoj masi, već u području Mr od 20 – 25 kDa, što ukazuje da je i on izrezan na velike fragmente (Fasoli i sur. 2011.). Sljedeći primjer ove pojave je još jedan protein visoke zastupljenosti, otkriven u vinu Recioto (bijelo desertno vino proizvedeno u regiji Veneto). Njegova teorijska Mr je 60746, a na gelu nakon SDS-PAG elektroforeze je također nađen u području Mr oko 20 kDa, što i ovdje ukazuje na produkt razgradnje. Zanimljivo opažanje u proteomu vina Recioto je da od 106 pronađenih genskih produkata veliku većinu čine proteini male molekulske mase, od 10 do 35 kDa. Dakle, proteini koji „prežive“ proces pripreme ovih pića su uglavnom oni male Mr, dok se proteini velike Mr raspadaju na fragmente ili su istaloženi iz otopine tijekom industrijske obrade (D'Amato i sur. 2011.). U slučaju proteina iz kokosovog mlijeka, 7S globulina i glutelina, na gelu dobivenom razdvajanjem proteina tehnikom SDS-PAGE također su detektirane male količine ovih proteina u području njihove očekivane Mr, što ukazuje na postojanje razgrađenih i nerazgrađenih oblika proteina, iako nerazgrađeni čine manje od 5% ukupnih proteina. Isto je primijećeno i u proteomu piva, gdje od 22 otkrivena genska produkta, 19 ima vrijednosti Mr između 10 i 33 kDa, a samo tri proteina imaju Mr 43000 Da (Fasoli i sur. 2010.).

Još jedan zanimljivi podatak je neobično vezanje proteina na laboratorijski pripremljena zrnca CPLL pri vrijednosti pH 2,2. U svim ostalim istraživanjima, ova datoteka (potpuno hidrofobna) i ova vrijednost pH su dale najbolje rezultate vezanja proteina na zrnca CPLL i najviše su pridonijele identifikaciji proteina. Međutim, u ovom istraživanju čini se da su se proteini najbolje vezali pri vrijednostima pH 7,0 i 9,3.

## 6. ZAKLJUČAK

Iz prethodno navedenih podataka jasno je da je istraživanje proteoma kokosovog mlijeka doseglo visoku razinu, a usporedba sa rezultatima sličnih istraživanja nije ni moguća obzirom da je ovakva analiza prvi put izvedena. Tretman primjenom tehnologije CPLL više je nego udvostručio broj istraženih proteina u kokosovom mlijeku. To je veoma važno i ovo istraživanje ima značajnu ulogu zbog široke primjene kokosovog mlijeka u ljudskoj prehrani diljem svijeta i zbog njegovih potencijalnih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje. Ovaj jedinstveni skup podataka može biti početna točka nutricionistima i znanstvenicima koji proučavaju ljekovite sastojke u hrani za enukleaciju proteina odgovornih za neke povoljne učinke na ljudsko zdravlje.

Problem nedostatka podataka, odnosno nedovoljne istraženosti proteina većine biljnih vrsta veliki je problem općenito u biljnoj proteomici, iako se ta disciplina trenutno prilično brzo razvija. Za daljnji napredak bit će potrebni genetičari koji su spremni uhvatiti se u koštac sa sekvenciranjem biljnih genoma u što većoj mjeri. Smatram da je veoma važno da se ta znanstvena disciplina dalje razvija, te da se istraže proteomi i zasebni proteini što više biljnih vrsta, iz razloga što i mnoge druge biljke imaju povoljna svojstva koja bismo mogli iskoristiti.

## 7. LITERATURA

- D'Amato A., Fasoli E., Kravchuk A.V., Righetti P.G. (2011.): Mehercules, adhuc Bacchus!  
The debate on wine proteomics continues. *J Proteome Res* 10, 3789 – 801
- D'Amato A., Fasoli E., Righetti P.G. (2012.): Harry Belafonte and the secret proteome of  
coconut milk. *J Proteomics* 75, 914 – 20
- Fasoli E., Aldini G., Regazzoni L., Kravchuk A.V., Citterio A., Righetti P.G. (2010.): Les  
Maitres de l'Orge: the proteome content of your beer mug. *J Proteome Res* 9, 5262 – 9
- Fasoli E., D'Amato A., Kravchuk A.V., Citterio A., Righetti P.G. (2011.): In-depth proteomic  
analysis of non-alcoholic beverages with peptide ligand libraries. I: Almond milk and  
orgeat syrup. *J Proteomics* 74, 1080 – 90
- Garcia R.N., Arocena R.V., Laurena A.C., Tecson-Mendoza E.M. (2005.): 11S and 7S  
globulins of coconut (*Cocos nucifera L.*): purification and characterization. *J Agric  
Food Chem* 53, 1734 – 9
- Kwon K., Hwa Park K., Knee Choon Rhee K. (1996.): Fractionation and characterization of  
proteins from coconut (*Cocos nucifera L.*). *J Agric Food Chem* 44, 1741 – 5
- Mepba H.D., Achinewhu S.C. (2003.): Effects of processing on protein nutritive quality of  
coconut *Cocos nucifera* products. *Plant Food Hum Nutr* 58, 15 – 25
- Nikolić, T. (2013.): Sistematska botanika. ALFA d.d., Zagreb, 459 – 66
- Salil G., Rajamohan T. (2001.): Hypolipidemic and antiperoxidative effect of coconut protein  
in hypercholesterolemic rats. *Indian J Exp Biol* 39, 1020 – 34
- Surojanametakul V., Doi H., Shibata H., Mizumura T., Takahashi T., Varanyanond W., et al.  
(2011.): Reliable enzyme linked immunosorbent assay for the determination of  
coconut milk proteins in processed foods. *J Agric Food Chem* 59, 2131 – 6
- [www.bbcgoodfood.com/howto/guide/ingredient-focus-coconut-milk](http://www.bbcgoodfood.com/howto/guide/ingredient-focus-coconut-milk)
- [en.wikipedia.org/wiki/Coconut\\_milk](http://en.wikipedia.org/wiki/Coconut_milk)
- [hr.wikipedia.org/wiki/Kokosova\\_palma](http://hr.wikipedia.org/wiki/Kokosova_palma)
- [www.ntbg.org/plants/plant\\_details.php?plantid=3054](http://www.ntbg.org/plants/plant_details.php?plantid=3054)

## 8. SAŽETAK

Kokosovo mlijeko je slatka, mliječno bijela tekućina, dobivena iz „mesa“ zrelog kokosa – ploda kokosove palme (*Cocos nucifera* L.). Bogato je vitaminima, mineralima i dobrim mastima te stoga ima veoma široku primjenu. Česta je namirnica u mnogim tropskim kuhinjama, na zapadu se uglavnom koristi kao napitak, a u veganskoj kuhinji služi kao zamjena za kravlje mlijeko kod kuhanja. Osim u prehrani, ima primjenu i u kozmetici, a smatra se da ima i mnoge povoljne utjecaje na ljudsko zdravlje. Proteom kokosovog mlijeka bio je opsežno mapiran putem snimanja na tri pH vrijedosti pomoću datoteka rekombiniranih peptidnih liganda (CPLL). Ukupno je identificirano 307 jedinstvenih genskih produkata: 170 ih je otkriveno primjenom metode CPLL na 3 vrijednosti pH, 107 je pronađeno u kontroli, odnosno netretiranom materijalu, a 30 proteina je bilo zajedničko u oba seta podataka. CPLL tretman više je nego udvostručio broj istraženih proteina u kokosovom mlijeku i time je istraživanje proteoma kokosova mlijeka doseglo jedinstvenu dubinu. Baza podataka za ovu biljku od ranije je sadržavala 123 proteina, a 6 od tih je navedeno u rezultatima ovog istraživanja. To znači da je većina otkrivenih proteina identificirana samo na temelju homologije sa sekvencama pohranjenim u glavnoj biljnoj bazi podataka. Dobiveni skup podataka može biti početna točka nutricionistima i znanstvenicima koji proučavaju ljekovite sastojke u hrani za enukleaciju proteina odgovornih za neke povoljne učinke na ljudsko zdravlje koji se pridaju kokosovom mlijeku.

## 9. SUMMARY

Coconut milk is a sweet, milky white liquid derived from the meat of mature coconut - the fruit of the coconut palm (*Cocos nucifera* L.). It is rich in vitamins, minerals and good fats and therefore has a very wide application. It is a common ingredient in many tropical cuisines, in the west is mainly used as a beverage, and in vegan cuisine it is used as a substitute for cow's milk. Other than in nutrition, it is also used in cosmetics, and is thought to have many beneficial effects on human health. The proteome of coconut milk has been extensively mapped via capture with combinatorial peptide ligand libraries (CPLL) at three pH values. A grand total of 307 unique gene products could be listed, 200 discovered via CPLL capture, 137 detected in the control, untreated material and 30 species in common between the two sets of data. CPLL treatment has more than doubled the total discovery of proteins in coconut milk, and with that the exploration of the coconut milk proteome has reached unprecedented depth. The database of this plant contained only 123 proteins, and 6 of those are listed in results of this exploration. It means that the vast majority of the classified proteins has been identified only by homologies with sequences deposited in the general *Viridiplantae* database. This unique set of data could be the starting point for nutritionists and researchers involved in nutraceuticals for enucleating proteins responsible for some of the beneficial health effects attributed to coconut milk.