

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Andrea B. Stefanović

**OPTIMIZACIJA ENZIMSKIH POSTUPAKA
ZA DOBIJANJE HIDROLIZATA PROTEINA
BELANCETA KAO KOMPONENATA
FUNKCIONALNE HRANE PRIMENOM
TEHNOLOGIJE ULTRAZVUKA VISOKOG
INTENZITETA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

MENTOR:

Dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Branko Bugarski, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Marica Rakin, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Mirjana Antov, redovni profesor,
Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet

Dr Sanja Grbavčić, naučni saradnik,
Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____

Ova doktorska disertacija urađena je u okviru istraživanja predloženih u projektu integralnih i interdisciplinarnih istraživanja (III 46010): „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u periodu od 2011. do 2017. godine. Veliki deo istraživanja ostvaren je i kroz Eureka projekat E!6750 između Republike Srbije i Republike Slovenije pod nazivom „Razvoj enzimskih procesa za proizvodnju hidrolizata proteina iz belanceta“ u periodu od 2011. do 2014. godine.

Eksperimentalni deo rada ove doktorske disertacije izveden je u laboratorijama na Katedri za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, Katedri za Hemijsko inženjerstvo i Katedri za Tekstilno inženjerstvo Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a deo eksperimenata urađen je na Katedri za Biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i na Katedri za Hemiju i Biohemiju Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

ZAHVALNICA

Od srca se zahvaljujem mojoj mentorki

dr Zorici Knežević-Jugović

redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta,

koja mi je nesebično otvorila vrata jednog potpuno novog sveta u kome me je svojom snagom, velikim iskustvom, a nadasve stručnošću i znanjem uvek držala na pravom putu. Hvala joj na divnoj saradnji, zalaganju i uloženom trudu, na hrabrosti, entuzijazmu, ogromnoj pozitivnoj energiji i poverenju koje mi je ukazala.

Beskrajno joj hvala!

*Veliko hvala **dr Branku Bugarskom**, red. prof. Tehnološko-metalurškog fakulteta i **dr Marici Rakin**, red. prof. Tehnološko-metalurškog fakulteta na diskusijama i korisnim sugestijama koji su doprineli kvalitetnijem istraživanju i oblikovanju ovog rada.*

*Najlepše hvala **dr Mirjani Antov**, red. prof. Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, na ukazanom vremenu i poverenju.*

*Posebnu zahvanost želim da iskažem **dr Sanji Grbavčić**, naučnom saradniku Inovacionog centra Tehnološko-metalurškog fakulteta, na toploj saradnji koja je na najlepší način unapredila kvalitet ove doktorske disertacije.*

*Neizmerno hvala kolegini dipl. inž. **Jeleni Jovanović**, na nesebičnoj pomoći, strpljenju i ohrabivanju u veoma važnim momentima tokom realizacije ove doktorske disertacije, kao i divnom prijateljstvu koje traje još od studentskih dana.*

Zahvaljujem se Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije koji su finansirali moj rad na doktorskoj tezi.

*Beskrajno hvala **dr Stevi Leviću**, docentu na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na otvorenosti za saradnju, logistici, prenesenim znanjima i lepoj saradnji.*

*Hvala koleginicama **dr Nataši Šekuljici** i **dr Sonji Jakovetić Tanasković**, na pomoći u eksperimentalnom radu i pozitivnoj energiji tokom zajedničkog rada, a naročito odmora.*

*Veliko hvala svim **dragim profesorima** sa Katedre za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju na znanju stečenom tokom studija.*

***Koleginicama i kolegama** sa Katedre za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju hvala na podršci, pomoći, druženju i uvek dobroj atmosferi čime su mi statistički značajno ($p < 0,05$) olakšali i pomogli realizaciju ove disertacije.*

*Najlepše hvala **dr Mariji Pavlović** kao i **dr Maji Bulatović** koje su uvek bile tu kad je bilo hitno.*

Mojim divnim prijateljima neizmerno hvala na iskrenoj podršci tokom svih ovih godina.

*Od sveg srca zahvaljujem se **mom Marku** na neizrecivoj ljubavi, razumevanju, podršci i ohrabrivanju, kao i na konkretnom doprinosu u prevazilaženju tehničkih nedostataka tokom pisanja ove doktorske disertacije.*

I na kraju, najveće hvala dugujem mojim roditeljima čiji je svaki treptaj oka bio ispunjen bezuslovnom ljubavlju, podrškom, ohrabrivanju i energiji koja obasjava moje srce. Njima u čast je od srca posvećena ova doktorska disertacija.

Najlepše vam hvala!

Optimizacija enzimskih postupaka za dobijanje hidrolizata proteina belanceta kao komponenata funkcionalne hrane primenom tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta

Rezime

Predmet naučnog istraživanja doktorske disertacije je razvoj novih netermičkih i enzimskih procesa za proizvodnju proteina belanceta i njihovih hidrolizata sa unapređenim tehnološko-funkcionalnim svojstvima kao visokokvalitetnih proteinskih dodataka hrani i napicima.

Iako proteini belanceta spadaju u veoma kvalitetne proteine, zbog svog jedinstvenog aminokiselinskog sastava i velike biološke vrednosti, njihova šira komercijalna primena kao proteinskih dodataka ishrani je ograničena zbog alergenosti, nedovoljne digestivnosti, termolabilnosti, velike viskoznosti i drugih. Primenom tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta kao i kontrolisanom i parcijalnom hidrolizom proteina belanceta mogu se unaprediti njihova fizičko-hemijska svojstva, smanjiti alergenost i osloboditi bioaktivni peptidi koji im dodeljuju dodatna svojstva funkcionalne hrane.

Razvoj efikasnog enzimskog postupka za dobijanje hidrolizata odgovarajućih senzornih i funkcionalnih svojstava je složen zadatak i zahteva izbor i optimizaciju pretretmana supstrata, adekvatni izbor jedne ili više proteaza, kao i optimizaciju enzimskog postupka. Najveća prepreka za komercijalnu primenu hidrolizata proteina belanceta je, za sada, neadekvatan procesni pretretman pri obradi i sterilizaciji belanceta, koji dovodi do značajne promene boje, ukusa, funkcionalnosti i nutritivnih svojstava proizvoda. To je razlog zbog čega je primena tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta postala fokus interesovanja poslednjih godina. Uticaju sonikacije na enzimsku hidrolizu proteina belanceta nije posvećeno dovoljno pažnje u literaturi, ali se primena ultrazvučnih talasa smatra brzom, efikasnom i pouzdanom tehnikom koja može dovesti do poboljšanja tehnološko-funkcionalnih svojstava proizvoda.

U skladu sa prethodno zabeleženim, osnovni cilj ove disertacije je da se doprinese razvoju enzimskog procesa hidrolize proteina belanceta i optimizaciji ultrazvučnog pretretmana kao adekvatnoj zameni za tradicionalni termički pretretman procesiranja proteina hrane u prehrambenoj industriji.

U prvom delu rada ispitan je uticaj osnovnih parametara ultrazvučnog pretretmana kao što su frekvenca ultrazvučnih talasa, snaga ultrazvuka, tip uređaja (ultrazvučno kupatilo, ultrazvučna sonda), temperatura i dužina trajanja pretretmana na stepen denaturacije proteina belanceta. Ispitana je mogućnost unapređenja tehnološko-funkcionalnih svojstava proteina belanceta poput rastvorljivosti, kapaciteta pene, stabilnosti pene, indeksa aktivnosti emulzije i indeksa stabilnosti emulzije usled primene odgovarajućeg ultrazvučnog pretretmana. Posebna pažnja posvećena je ispitivanju uticaja ultrazvuka pod različitim uslovima na strukturu molekula u cilju pronalaženja odgovarajuće korelacije između intenziteta, režima i dužine primenjenog pretretmana, strukture molekula proteina i njihovih tehnološko-funkcionalnih svojstava.

Utvrđen je porast kapaciteta pene (KP), stabilnosti pene (SP), indeksa aktivnosti emulzije (IAE) i indeksa stabilnosti emulzije (ISE) nativnih proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz (UZS-20kHz), kao i ultrazvukom u kupatilima frekvence 40 kHz i 35 kHz (UZK-40kHz i UZK-35kHz). Vreme pretretmana od 15 min dalo je najbolje rezultate emulgujućih svojstava i svojstava penjenja za sva tri ultrazvučna pretretmana. Pretretman proteina belanceta sondom UZS-20kHz prouzrokovao je pomeranje raspodele veličine čestica ka manjim prečnicima i uticao je na smanjenje polidisperznog indeksa, dok pretretman UZK-40kHz nije u tolikoj meri uticao na smanjenje čestica agregiranih molekula proteina belanceta. Dobijena je negativna linearna korelacija između veličine čestica i rastvorljivosti proteina belanceta nakon primene UZS-20kHz, a međusobna zavisnost između *IAE* i *ISE* i veličine čestica je, takođe, potvrđena i ustanovljeno je da sa smanjenjem čestica dolazi do poboljšanja emulgujućih svojstava primenom pretretmana UZS-20kHz. Ramanovom spektroskopijom pokazano je da je su pretretman sondom UZS-20kHz i ultrazvučni tretman u kupatilu UZK-40kHz uticali na promenu sekundarne strukture proteina belanceta i ustanovljeno je da je pretretman UZS-20kHz imao veći uticaj na strukturalna svojstva.

Druga celina bila je posvećena optimizaciji procesnih parametara i načinima izvođenja enzimske hidrolize ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta. Izborom jedne ili više proteaza kao biokatalizatora procesa i podešavanjem procesnih parametara enzimske hidrolize ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta u šaržnom reaktorskom sistemu, usvojen je najefikasniji enzimski postupak za dobijanje hidrolizata sa poboljšanim

funkcionalnim svojstvima. Takođe, određen je i kinetički model hidrolize proteina belanceta u šaržnom reaktoru, koji valjano opisuje tok reakcije i na osnovu koga je moguće predvideti stepene hidrolize i sastave hidrolizata u dužem vremenskom periodu.

Brzine enzimske reakcije su bile veće nakon sva tri ultrazvučna pretretmana u poređenju sa hidrolizom intaktnih proteina belanceta, a kao najefikasniji pokazao se pretretman ultrazvučnom sondom UZS-20kHz. Vreme pretretmana od 15 min usvojeno je kao optimalno. Ovi rezultati su potpuno u skladu sa utvrđenim promenama u strukturi proteina belanceta usled dejstva ultrazvuka frekvence 15 kHz u toku 15 min. Primenom jednostepenog enzimskog postupka, alkalaza se pokazala kao najefikasnija, dok je u dvostepenom enzimskom postupku kombinacija enzima alkalaze i neutraze dala najveće prinose peptida i stepene hidrolize. Usvojen je empirijski kinetički model, koji uzima u obzir inhibiciju supstratom u višku i dezaktivaciju enzima u skladu sa kinetikom drugog reda, kao pogodan za opisivanje procesa enzimske hidrolize ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta u šaržnom reaktorskom sistemu. Najveća konstanta brzine reakcije dobijena je nakon pretretmana ultrazvučnom sondom UZS-20kHz, dok je najmanje povećanje brzine reakcije ostvareno nakon pretretmana UZK-35kHz. Pretretman UZS-20kHz uticao je na poboljšanje tehnološko-funkcionalnih svojstava (rastvorljivosti, kapaciteta i stabilnosti pene, emulgujućih svojstava) hidrolizata dobijenih hidrolizom pomoću alkalaze i papaina, što je prouzrokovano promenama strukture molekula. Nakon hidrolize alkalazom, ostvarena je veća površinska hidrofobnost u vremenskim intervalima od 2-15 min, dok kod hidrolizata papaina nije primećen statistički značajan ($p > 0,05$) porast površinske hidrofobnosti sa vremenom ultrazvučnog pretretmana.

Poslednji deo ove doktorske disertacije posvećen je dobijanju hidrolizata proteina u formi praha. Optimizovan je proces sušenja različitim postupcima (liofilizacija i sprej sušenje) i dobijeni prahovi su okarakterisani sa aspekta organoleptičkih, tehnološko-funkcionalnih i fizičko-hemijskih svojstava. Posebna pažnja bila je usmerena na očuvanje tehnološko-funkcionalnih svojstava dobijenih hidrolizata u toku sušenja, jer je upravo čitav proces, koji je prethodio sušenju, optimizovan sa ciljem dobijanja hidrolizata sa poboljšanom funkcionalnošću.

Rezultati dobijeni u toku rada na ovoj doktorskoj disertaciji dali su naučni doprinos objašnjenju mehanizma delovanja ultrazvučnih talasa na strukturu proteina belanceta i

uspostavljena je korelacija između promena u strukturi molekula, koje su manifestovane promenom sadržaja reaktivnih i ukupnih sulfhidrilnih grupa, stepena hidrofobnosti i naelektrisanja površine, veličine čestica (mera agregacije među molekulima) sa tehnološko-funkcionalnim svojstvima. Sinergistički efekat ultrazvučnog pretretmana i naknadne enzimske hidrolize detaljno je objašnjen i utvrđen je njihov uticaj na tehnološko-funkcionalna svojstva proteina belanceta, što predstavlja značajan doprinos u razumevanju mehanizma delovanja ultrazvučnih talasa na proteine belanceta. Na osnovu ovih činjenica, može se zaključiti da su funkcionalnost hidrolizata i njihova struktura veoma povezani i da su unapređena funkcionalna svojstva direktna posledica promene strukture proteina belanceta izazvane ultrazvučnim talasima visoke frekvence, čiji je uticaj delimično zadržan i nakon enzimske hidrolize. Međutim, kako dolazi do raskidanja peptidnih veza u molekulu pod dejstvom enzima u toku hidrolize, naravno da se može pričati samo o kombinovanom uticaju ultrazvuka i enzima. Dobijen je potpuno okarakterisan hidrolizat proteina belanceta u tečnoj formi i osušen u vidu praha. Ostvareni rezultati mogu poslužiti kao osnova za uvođenje novih tehnoloških postupaka za obradu prirodnih proteina sa svrhom poboljšanja njihovih funkcionalnih, nutritivnih i organoleptičkih svojstava u cilju razvoja novih prehrambenih proizvoda.

Ključne reči: proteini belanceta, ultrazvučni pretretman, enzimaska hidroliza, strukturna karakterizacija, tehnološko-funkcionalna svojstva.

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

UDK broj: 591.133.2:665.939.1/.2:66.084.8

Optimization of enzymatic processes in order to obtain egg white protein hydrolysates as a functional food component applying the high-intensity ultrasound technology

Summary

The scope of this academic doctoral research is the development of new non-thermal and enzymatic processes in order to obtain high-quality egg white protein and their hydrolysates with improved technological-functional properties as high-quality protein additives for food and beverages.

Despite egg white proteins are part of really quality proteins, because of unique amino acid composition and high biological values, their wide commercial use as protein ingredients in foods is limited. Main causes are allergenicity, insufficient digestion, thermolability, high viscosity and many others. High-intensity ultrasound technology as well as controlled and partial enzymatic hydrolysis of egg white proteins have shown a great potential to improve their functional properties and to reduce protein allergenicity while releasing bioactive peptides and assigning them additional functional properties.

The development of effective enzymatic processes for the preparation of egg white protein hydrolysates with appropriate sensory and functional properties is a rather difficult task which requires the choice and optimisation of substrat pretreatment, adequate selection of one or more proteases, as well as enzymatic process optimization.

At present, expanded egg white hydrolysates utilization is impeded by inadequate functional properties caused by processing treatments during commercial production that alter egg white protein physico-chemical properties and nutritional quality, among then the thermal treatment is one of the most damaging to the proteins. This places the high-intensity ultrasound technologies at the top of research interest during last years. There has not still been given relevant importance in literature on the study of the influence of sonication on egg white protein hydrolysates. However, the use of ultrasound waves could be considered quick, efficient and reliable technology which will be able to improve the technological-functional properties of natural proteins.

In accordance with before mentioned features, the fundamental scope of this doctoral research is to contribute to design of an efficient enzymatic hydrolytic process and to

optimization of ultrasound pretreatment as an adequate replacement of the traditional thermal pretreatment of proteins in food industry.

In the first part of the research, the effects of fundamental ultrasound pretreatment parameters on degree of egg white protein denaturation have been studied like ultrasound wave frequencies, ultrasound power, type of device (ultrasonic bath, ultrasound probe), temperature and time of pretreatment. The possibility of improving the technological-functional properties of egg white proteins, such as solubility, foam capacity, foam stability, emulsion activity index and emulsion stability index due to the application of the appropriate ultrasonic pretreatment, has been investigated. Moreover, the protein structure change, particle morphology and particle size distribution during the ultrasound pretreatment under different conditions have been also analysed. Special attention was given to study the effect of ultrasound treatment under different conditions on functional and structural properties of egg white proteins, and to determine if there was a correlation between particle and/or structural properties of the protein and its technological-functional properties.

An increase in foam capacity (KP), foam stability (SP), emulsion activity index (IAE) and emulsion stability index (ISE) of native egg white proteins pretreated with 20 kHz ultrasound probe (UZS-20kHz), as well as ultrasound in baths of frequencies 40 kHz and 35 kHz (UZK-40kHz and UZK-35kHz) were established. The pretreatment time of 15 min appeared to be the most effective to improve both, emulsifying properties and foaming properties for all three ultrasonic pretreatments. The pretreatment of egg white proteins with a UZS-20kHz probe caused the movement of the particle size distribution to smaller diameters and influenced the decrease in the polydispersion index, while the UZK-40kHz pretreatment did not, in such a way, affect the reduction of particles of aggregated protein molecules. A negative linear correlation between the particle size and the solubility of egg white proteins after application of UZS-20kHz was obtained, while a two-step linear correlation between the foam capacity (FC)/foam stability (FS) and particle size was apparent. Specifically, FC and FS sharply increased with decreasing particle size for range from ~370 to ~260 nm, and below this range from 260.6 to 68.4 nm, the changes were not that substantial. Besides, the solubility, FC, and FS were directly and linearly related with the absolute value of the particle zeta potential. The overall emulsifying properties were

also improved with an increase of sonication time, through both the decrease of the mean particle diameter and the increase of zeta potential, but there was no direct correlation between the emulsion activity/stability index and protein particle size and/or charge. Analysis of egg white protein structure by Raman spectroscopy revealed that both UZS-20kHz probe and ultrasound treatment in the UZK-40kHz bath caused the changes in the secondary structure, while the UZS-20kHz pretreatment had a greater influence on the structural properties.

The second part of the research regards the optimization of process parameters and design of enzymatic hydrolysis of ultrasound pretreated egg white proteins. By choosing one or more proteases as biocatalysts and adjusting the process parameters of egg white protein hydrolysis in the batch reactor system, it was adopted the most effective enzymatic process for obtaining the hydrolysate with improved functional composition. Furthermore, the kinetic model of egg white protein hydrolysis in the batch reactor system was established. The kinetic model properly describes the progress of the enzymatic reaction, and also, gives prediction of the degree of hydrolysis and hydrolysates compositions in long time period.

The rates of enzymatic reactions were greater after all three ultrasound pretreatments compared to the hydrolysis of intact egg white proteins, and the ultrasound UZS-20kHz probe pretreatment proved to be the most effective. The 15-minute pretreatment time was adopted as optimal. These results are fully in line with the determined changes in the structure of egg white proteins due to the effect of ultrasound frequency of 15 kHz for 15 min. By using a single-step enzymatic method, alcalase proved to be the most effective, while in the two-step enzymatic process, the combination of alcalase and neutrase yielded the highest yields of the peptide and the degree of hydrolysis. An empirical kinetic model was adopted, taking into account the substrate inhibition in excess and the enzyme deactivation according to the second order kinetics, suitable for describing the process of enzymatic hydrolysis of ultrasonically pretreated egg white proteins in the batch reactor system. The highest rate of reaction was obtained after the ultrasonic probe pretreatment UZS-20kHz, while minor increase in the reaction rate was achieved after the pretreatment UZK-35kHz. The pretreatment of the UZS-20kHz influenced the improvement of the technological-functional properties (solubility, capacity and stability of foam, emulsifying

properties) of hydrolysates obtained by hydrolysis with alcalase and papain, which is caused by changes in the structure of the molecules. After alcalase-catalyzed hydrolysis, a greater surface hydrophobicity was achieved at 2-15 min time intervals, while in papain hydrolysis, statistically significant ($p > 0.05$) increased surface hydrophobicity with the time of ultrasonic pretreatment was determined.

The final part of the research was concentrated on getting egg white protein hydrolysates in powder form. The drying process was optimized with different steps such as lyophilization and spray drying. Obtained powders were analyzed in terms of organoleptic and technological-functional features, as well as physical and chemical composition. Especially, the focus was on preservation of functional properties of obtained hydrolysis during the process of drying. It should be noticed that the entire process, before the drying, was optimized with the purpose of getting hydrolysates with improved functional features.

Results obtained from this doctoral thesis, give the research contribution in explaining the mechanism of high intensity ultrasound effects on egg white protein structure and the correlation between changes in the structure of molecules, which were manifested by the change in the content of reactive and total sulfhydryl groups, the degree of hydrophobicity and surface charge, particle size (aggregation measure among molecules) and technological-functional properties is established. The synergistic effect of ultrasonic pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis has been explained in detail, and their effect on improved technological and functional properties of egg white proteins has been identified, which is a significant contribution in understanding the mechanism of action of ultrasonic waves on protein denaturation. Based on these facts, it can be concluded that the functionality of the hydrolysates and their structure are highly interconnected and that the improved functional properties are a direct consequence of the change in the structure of egg white proteins caused by ultrasonic waves of high intensity, whose influence is even partially retained after enzymatic hydrolysis. However, as the breakup of peptide bonds in the molecule occurs under the action of the enzyme during hydrolysis, of course, one can only talk about the combined effect of ultrasound and enzymes. Completely characterized egg white protein hydrolysates was obtained in liquid form and dried in powder form. These achieved results may be of help as basis for new technological processes for the

processing of natural proteins with the aim to further improve their functional, nutritious and organoleptic properties in order to develop new food products.

Key words: egg white proteins, ultrasound treatment, enzymatic hydrolysis, structural characterization, technological-functional properties.

Research field: Technological Engineering

Specilaized research filed: Biochemical Engineering and Biotechnology

UDK number: 591.133.2:665.939.1/.2:66.084.8

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
TEORIJSKI DEO.....	4
2. PROTEINI BELANCETA.....	4
2.1. FIZIČKO-HEMIJSKA SVOJSTVA PROTEINA BELANCETA	5
2.1.1. <i>Osnovni proteini belanceta.....</i>	8
2.1.1.1. Ovalbumin	8
2.1.1.2. Ovotransferin.....	10
2.1.1.3. Ovomukoid.....	11
2.1.1.4. Ovomucin	12
2.1.1.5. Lizozim.....	13
2.1.2. <i>Manje zastupljeni proteini belanceta.....</i>	15
2.1.2.1. Ovoglobulin.....	15
2.1.2.2. Avidin.....	15
2.1.2.3. Ovoinhibitor	16
2.1.2.4. Cistatin.....	16
2.1.2.5. Ovoglikoprotein i ovomakroglobulin	17
2.1.2.6. Ovo flavoprotein.....	17
3. ULTRAZVUK.....	18
3.1. MEHANIZAM DEJSTVA ULTRAZVUČNIH TALASA	19
3.2. FAKTORI KOJI UTIČU NA KAVITACIJU	23
3.3. PRIMENA ULTRAZVUKA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI.....	25
3.4. FIZIČKO-HEMIJSKE PROMENE PROTEINA IZAZVANE ULTRAZVUČNIM TALASIMA	27
3.5. RAMANOVA SPEKTROSKOPIJA	33
4. TEHNOLOŠKO-FUNKCIONALNA SVOJSTVA PROTEINA.....	35
4.1. STANJA PROTEINSKIH MOLEKULA KOJA UTIČU NA FUNKCIONALNOST PROTEINA	38
4.1.1. <i>Nativno stanje proteina.....</i>	38
4.1.2. <i>Denaturisano stanje proteina</i>	38
4.1.3. <i>Stanje rastopljene globule (stanje delimično uređene konformacije).....</i>	41
4.2. FUNKCIONALNA SVOJSTVA PROTEINA BELANCETA	42
4.2.1. <i>Svojstva penjenja</i>	42

4.2.2.	<i>Emulgaciona svojstva</i>	46
4.2.3.	<i>Rastvorljivost</i>	48
4.2.4.	<i>Svarljivost proteina (digestibilnost)</i>	50
4.3.	POVRŠINSKE KARAKTERISTIKE MOLEKULA PROTEINA.....	52
4.3.1.	<i>Hidrofobnost</i>	52
4.3.2.	<i>Sulfhidrilne grupe</i>	53
5.	ENZIMSKA HIDROLIZA	54
5.1.	ENZIMSKA HIDROLIZA PROTEINA	54
5.2.	STEPEN HIDROLIZE (SH).....	58
5.3.	PROTEAZE	62
5.3.1.	<i>Osnovna svojstva i klasifikacija proteaza</i>	64
5.3.1.2.	<i>Serinske proteaze</i>	65
5.3.1.3.	<i>Aspartatne proteaze</i>	68
5.3.1.4.	<i>Cisteinske proteaze</i>	70
5.3.1.5.	<i>Metalo - proteaze</i>	71
5.4.	PROTEAZE ZA HIDROLIZU PROTEINA BELANCETA	72
5.4.1.	<i>Alkalaza, proteaza iz Bacillus licheniformis</i>	72
5.4.2.	<i>Flevorzim, proteaza iz Aspergillus oryzae</i>	73
5.4.3.	<i>Neutraza, proteaza iz Bacillus amyloliquefaciens</i>	74
5.4.4.	<i>Papain, proteaza iz Carica papaya</i>	74
	EKSPERIMENTALNI DEO	77
6.	MATERIJALI I METODE	77
6.1.	MATERIJALI	77
6.2.	INSTRUMENTI.....	78
6.3.	METODE.....	79
6.3.1.	<i>Pretretman rastvora belanceta ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz</i>	79
6.3.2.	<i>Pretretman rastvora belanceta ultrazvučnim kupatilom frekvence 40 kHz</i>	80
6.3.3.	<i>Pretretman rastvora belanceta ultrazvučnim kupatilom frekvence 35 kHz</i>	80
6.3.4.	<i>Određivanje snage ultrazvuka</i>	81
6.3.5.	<i>Termički pretretman rastvora belanceta</i>	81
6.3.6.	<i>Jednostepena enzimaska hidroliza proteina belanceta u šaržnom reaktoru sa mešanjem</i>	82

6.3.7.	<i>Dvostepena enzimaska hidroliza proteina belanceta u šaržnom reaktoru sa mešanjem</i>	84
6.3.8.	<i>Kinetika hidrolize proteina belanceta u šaržnom reaktorskom sistemu</i>	85
6.3.9.	<i>Izvođenje empirijskog kinetičkog modela</i>	85
6.3.10.	<i>Određivanje sadržaja proteina Lorijevom metodom</i>	88
6.3.11.	<i>Metode za određivanje tehnološko-funkcionalnih svojstava</i>	89
6.3.11.1.	<i>Određivanje rastvorljivosti</i>	89
6.3.11.2.	<i>Određivanje kapaciteta penjenja i stabilnosti pene</i>	89
6.3.11.3.	<i>Određivanje emulgujućih svojstava</i>	90
6.3.11.4.	<i>Određivanje svarljivosti (digestibilnost)</i>	91
6.3.11.5.	<i>Određivanje redukujuće moći</i>	91
6.3.12.	<i>SDS-PAGE elektroforeza</i>	92
6.3.13.	<i>Merenje raspodele veličine čestica</i>	95
6.3.14.	<i>Metode za određivanje površinskih karakteristika</i>	95
6.3.14.1.	<i>Merenje naelektrisanja čestica (zeta potencijal, Z_0)</i>	95
6.3.14.2.	<i>Merenje površinske hidrofobnosti (H_0)</i>	96
6.3.14.3.	<i>Određivanje sadržaja sulfhidrilnih (SH) grupa</i>	97
6.3.15.	<i>Sušenje raspršivanjem (sprej sušenje) i sušenje zamrzavanjem (liofilizacija)</i>	98
6.3.16.	<i>Metode za određivanje funkcionalnih, senzornih i organoleptičkih svojstava prahova</i>	99
6.3.16.1.	<i>Određivanje disperzionog vremena</i>	99
6.3.16.2.	<i>Određivanje kapaciteta vezivanja vode i ulja</i>	100
6.3.16.3.	<i>Određivanje senzornih svojstava</i>	100
6.3.16.4.	<i>Merenje koordinata boje prahova hidrolizata proteina belanceta</i>	100
6.3.16.5.	<i>Merenje naelektrisanja prahova (zeta potencijal)</i>	102
6.3.16.6.	<i>Određivanje hemijskog sastava</i>	102
6.3.17.	<i>Uklanjanje soli (odsoljavanje) procesom dijalize</i>	102
6.3.18.	<i>Strukturna i morfološka karakterizacija</i>	103
6.3.18.1.	<i>Vizualizacija površinske strukture korišćenjem tehnike skenirajuće elektronske mikroskopije sa emisijom polja (FE-SEM)</i>	103
6.3.18.2.	<i>Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)</i>	104
6.3.18.3.	<i>Ramanova spektroskopija</i>	105
6.3.19.	<i>Mikrobiološke analize</i>	106
6.3.19.1.	<i>Ukupan sadržaj mikroorganizama</i>	106

6.3.20. Statistička obrada eksperimentalnih podataka.....	107
7. REZULTATI I DISKUSIJA	108
7.1. UTICAJ DEJSTVA ULTRAZVUČNIH TALASA NA TEHNOLOŠKO-FUNKCIONALNA SVOJSTVA PROTEINA BELANCETA	108
7.1.1. Rastvorljivost (R_0).....	108
7.1.2. Kapacitet i stabilnost pene.....	110
7.1.3. Emulgujuća svojstva	113
7.2. UTICAJ DEJSTVA ULTRAZVUČNIH TALASA NA POVRŠINSKE KARAKTERISTIKE MOLEKULA PROTEINA BELANCETA	115
7.2.1. Sadržaj sulfhidrilnih grupa.....	115
7.2.2. Površinska hidrofobnost (H_0)	117
7.2.3. Zeta potencijal (Z_0).....	119
7.3. UTICAJ ULTRAZVUČNOG PRETRETMANA NA VELIČINU ČESTICA.....	122
7.4. FE-SEM ANALIZA	130
7.5. STRUKTURNI KARAKTERIZACIJA.....	132
7.6. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA	136
7.7. ENZIMSKA HIDROLIZA PROTEINA BELANCETA U ŠARŽNOM REAKTORSKOM SISTEMU	138
7.7.1. Optimizacija procesa enzimске hidrolize proteina belanceta primenom različitih vrsta proteaza	138
7.8. UTICAJ ULTRAZVUČNOG PRETRETMANA NA ENZIMSKU HIDROLIZU PROTEINA BELANCETA	143
7.8.1. Optimizacija uslova izvođenja ultrazvučnog pretretmana.....	143
7.8.2. Uticaj kombinovanog dejstva ultrazvuka i pH pretretmana na stepen hidrolize proteina belanceta.....	148
7.8.3. Prosečna dužina peptidnih lanaca hidrolizata	149
7.9. UTICAJ ULTRAZVUČNOG PRETRETMANA NA KINETIKU REAKCIJE HIDROLIZE PROTEINA BELANCETA	151
7.9.1. Određivanje kinetičkih parametara i kinetičkih konstanti.....	155
7.10. KARAKTERIZACIJA HIDROLIZATA PROTEINA BELANCETA DOBIJENIH POMOĆU ALKALAZE I PAPAINE	158
7.10.1. Uticaj dužine pretretmana UZS-20kHz i vrste enzima na enzimsku hidrolizu proteina belanceta.....	159

7.10.2. Uticaj dužine pretretmana UZS-20kHz i vrste enzima na funkcionalna svojstva hidrolizata proteina belanceta (HPB).....	161
7.10.3. Uticaj dužine pretretmana UZS-20kHz i vrste enzima na površinske karakteristike hidrolizata proteina belanceta.....	169
7.10.4. FTIR analiza hidrolizata dobijenih pomoću alkalaze i papaina.....	172
7.10.5. FE-SEM analiza hidrolizata dobijenih pomoću alkalaze i papaina.....	174
7.11. KARAKTERIZACIJA DOBIJENIH HIDROLIZATA NAKON POSTHIDROLITIČKIH TEHNOLOŠKIH POSTUPAKA.....	177
7.11.1. Optimizacija i izbor tehnike sušenja ultrazvučno pretretiranih vodenih rastvora hidrolizata proteina belanceta.....	178
7.11.2. Karakterizacija praškastih hidrolizata sa aspekta funkcionalnih, organoleptičkih i senzornih svojstava.....	185
7.11.2.1. Tehnološko-funkcionalna svojstva.....	186
7.11.2.2. Zeta potential.....	191
7.11.2.3. Instrumentalno određivanje boje prahova hidrolizata proteina belanceta	192
7.11.2.4. Senzorna analiza praškastih hidrolizata proteina belanceta	196
8. ZAKLJUČAK	201
9. LITERATURA	206

1. UVOD

Proteini belanceta poseduju jedinstvene funkcionalne karakteristike, kao što su odlično geliranje, penjenje i aminokiselinski sastav, ali je njihova šira komercijalna primena kao proteinskih dodataka ishrani, posebno u slučaju dijetetskih suplemenata i hrane za decu, ograničena zbog velike viskoznosti, alergenosti, nedovoljne digestivnosti i termolabilnosti [1-4]. Navedena svojstva proteina belanceta se mogu značajno poboljšati kontrolisanom enzimskom hidrolizom, kako u pogledu smanjenja alergenog potencijala, tako i u pogledu povećanja njihove rastvorljivosti, svarljivosti i funkcionalne vrednosti [5]. Stoga nije iznenađujuće što proteini belanceta predstavljaju veoma značajan suplement u pekarskim proizvodima, kolačima, mesnim prerađevinama i u industriji hrane uopšte.

U poređenju sa nativnim proteinima, hidrolizati su manje viskozni, lakše se umešavaju, imaju smanjen alergeni potencijal, veću rastvorljivost i značajno su svarljiviji. Činjenica koja je od izuzetnog značaja je da se parcijalnom i kontrolisanom enzimskom hidrolizom proteina belanceta mogu osloboditi bioaktivni di- i tripeptidi koji imaju antioksidativnu, antihipertenzivnu i antimikrobnu aktivnost zbog čega se dobijeni hidrolizati mogu koristiti kao bioaktivni suplementi funkcionalnoj hrani [6]. Međutim, nutritivni proteini i bioaktivni peptidi su nestabilna jedinjenja koja mogu da promene hemijsku strukturu hidrolizata, često imaju naprijatan gorak ukus ili mogu da zadrže alergnost nakon procesa. Zbog toga, proizvodnja ovih nestabilnih bioaktivnih hidrolizata zahteva korišćenje inovativnih tehnologija koje omogućavaju zadržavanje biološke aktivnosti i određena svojstva date supstance u toku proizvodnje, bez obrazovanja neželjenih sporednih proizvoda i efekata. Efikasnost ovog procesa zavisi od mnogo faktora od kojih su najvažniji vrsta i koncentracija enzima, pretretman i koncentracija supstrata (proteini), temperatura, pH, način vođenja procesa, operativni uslovi i konfiguracija reaktora.

Gotovo svi proteini belanceta, uključujući ovalbumin i ovotransferin, u svojoj nativnoj formi pokazuju malu osetljivost na proteolitičke enzime kao što su alkalaza, tripsin ili α -himotripsin. Pregledom literature ustanovljeno je da termički denaturisan ovalbumin pokazuje veći afinitet ka gore spomenutim proteazama. Međutim, pokazalo se da najviše negativnih propratnih efekata ima upravo termički tretman belanceta na visokim temperaturama zbog odvijanja složene Majlardove i drugih reakcije, što dovodi do

tamnjenja i nastajanja jedinjenja sa toksičnim, mutagenim i teratogenim efektima. U toku termičkog postupka u blago alkalnoj sredini dolazi i do neselektivne i nekontrolisane hidrolize proteina, kao i njihove ireverzibilne denaturacije, tako da se značajno smanjuje nutritivna vrednost proizvoda. Dodatni problem je što se tokom termičkog postupka ne smanjuje alergnost ovalbumina i drugih proteina belanceta, jer su alergeni hrane generalno otporni na termički tretman. Zbog toga, kao alternativa tradicionalnoj termičkoj obradi, sve više se preporučuju netermički tretmani belanceta i enzimska hidroliza proteina, zbog velikog broja prednosti i dugoročnih efekata proizvodnje koji se mogu postići.

Usled negativnih efekata termičkog pretretmana proteina belanceta, razvoj inovativnih tehnologija i novih metoda koje će poboljšati funkcionalna svojstva proteina belanceta je glavni izazov naučnika danas. Primena tehnologije visokog pritiska ima veliki potencijal za sterilizaciju i obradu belanceta, jer omogućava inaktivaciju mikroorganizama i time produženje trajnosti proizvoda uz manji uticaj na senzorna i nutritivna svojstva od konvencionalnog termičkog postupka. Pored toga, ovaj tretman potencijalno može da doprinese smanjenju alergnosti proteina i efikasnijoj enzimskoj hidrolizi koja se izvodi nakon toga, usled promene konformacije i odgovarajuće denaturacije proteina. Međutim, uprkos velikom potencijalu, ova relativno nova tehnologija se koristi samo u par slučajeva, dok se veoma malo zna o efektima pritiska na strukturu i funkcionalna svojstva proteina belanceta. Pored toga postoji i više problema u toku izvođenja tretmana visokim pritiskom kao što su: veliki ekonomski troškovi pri intenzivnom tretmanu, neuniformni prenos toplote što dovodi do gradijenta temperature i rizik od ireverzibilne denaturacije proteina usled lokalnog pregrevanja. To je razlog zbog čega je primena ultrazvučnih talasa postala fokus interesovanja poslednjih godina. Uticaju sonikacije na proteina belanceta i njihovu naknadnu enzimsku hidrolizu nije posvećeno dovoljno pažnje u literaturi, ali se primena ultrazvučnih talasa smatra brzom, efikasnom i pouzdanom tehnikom koja može dovesti do poboljšanja kvaliteta hrane i plasiranja novih proizvoda na tržište sa jedinstvenim funkcionalnim svojstvima. Kao što je naglašeno u mnogim naučnim radovima, primenom ultrazvučnog pretretmana može se uticati na promenu strukture molekula proteina. Na primer, primena ultrazvuka na hidrolizu ovotransferina termolizinom je dovela do strukturnih promena molekula proteina, koje su se ogledale u povećanju reaktivnih sulfhidrilnih grupa, dok se nakon hidrolize proteina belanceta taj uticaj odrazio na

povećanje površinske hidrofobnosti molekula proteina belanceta. Pored ovoga, primena ultrazvučnog pretretmana dovela je do promene tehnološko-funkcionalnih svojstava proteina kao što su, rastvorljivost, emulgaciona svojstva, kapacitet penjenja, viskoznost i ACE (*na engl.* angiotensin converting enzyme) inhibitorna aktivnost [7,8].

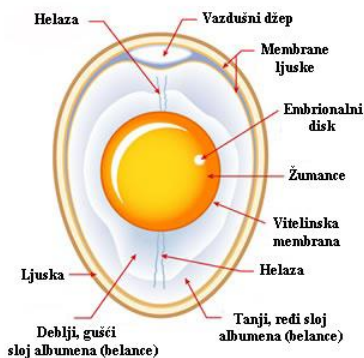
Štaviše, hidrolizati proteina belanceta dobijeni enzimskom hidrolizom pomoću odgovarajućih proteaza pokazuju antioksidativnu, antimikrobnu i ACE inhibitornu aktivnost [1,9-13]. Ovi hidrolizati, takođe, imaju pozitivan uticaj na razne funkcije u ljudskom organizmu i pozitivno utiču na zdravlje. Bez obzira što su proteini belanceta dostupni u izobilju, ljudska potrošnja proizvoda od jaja je ograničena. Stoga, proizvodnja hidrolizata proteina belanceta sa odgovarajućom biološkom aktivnošću i poboljšanim funkcionalnim svojstvima može imati i ekonomski značaj isto koliko i procesni.

TEORIJSKI DEO

2. PROTEINI BELANCETA

Proteini belanceta su postali predmet interesovanja i istraživanja proteklih par decenija. U početku se smatralo da se belance sastoji od samo jednog proteina, ali su eksperimenti vezani za koagulaciju, precipitaciju i frakcionisanje dali potvrdu da se belance ipak sastoji od više proteinskih frakcija sa različitim osobinama. Rastvaranjem određene frakcije u poluzasićenom rastvoru amonijum-sulfata dokazano je da se ona sastoji od tri proteina, (1) kristalnog albumina koga su Ozborn (Osborne) i Kembel (Campbell) nazvali „ovalbumin“, (2) nekristalnog albumina, koji je dobio ime „konalbumin“, odnosno ovotransferin i (3) nekoagulacioni protein koji je po Merneru (Mörner) nazvan „ovomukoid“, jer je on prvi definisao kompleksu prirodu ovog proteina. Hektoen (Hektoen) i Kol (Cole) (1928) su imunološkim tehnikama potvrdili prisustvo ovalbumina, konalbumina i ovomukoida u belancetu [14-17].

Belance, poznato i po nazivu albumen, predstavlja vodeni rastvor koji ima strukturu sličnu gelu koja je posledica prisustva ovomucina unutar belanceta. Ovomucin spada u fibrilarne proteine i smatra se odgovornim za sluzavu formu belanceta [18]. Oko 63% ukupne mase jajeta čini belance i može se reći da se ono sastoji od dva sloja, gušćeg, debljeg sloja (spoljašnji sloj) i ređeg, tanjeg sloja (unutrašnji sloj) (Slika 2.1). Spoljašnji, gušći sloj je zaštićen vitelinskom membranom (membrana žumanceta), dok je unutrašnji sloj prepoznatljiv po prisustvu lanaca helaze koji imaju funkciju da zadrže žumance u centru belanceta [19,20]. Glavna razlika između ove dve različite forme belanceta je u njihovoj viskoznosti, koja je mnogo veća kod gušćeg, debljeg sloja, zbog visokog sadržaja ovomucina, dok su druge razlike uglavnom posledica različitog proteinskog sastava [19]. Proteinski sastav belanceta je detaljnije objašnjen u narednom odeljku.



Slika 2.1. Struktura jajeta

Zbog odličnih emulgacionih svojstava, dobrom penjenju i geliranju, kao i zbog sadržaja visoko-kvalitetnih i hranljivih proteina, gotovo je nemoguće zanemariti značaj belanceta u prehrambenoj industriji. Proteini belanceta su netoksični, imaju nisku cenu, a za lizozim, koji je sastavni deo belanceta, utvrđeno je da potpomaže stabilizaciji enzima i da poseduje antibakterijsku aktivnost [21-23]. Istraživači su belance jajeta koristili za koimobilizaciju enzima kao što su katalaza, invertaza, kao i za imobilizaciju ćelija [22,23]. Iz ovog razloga mnogi istraživači su svoja istraživanja usmerili na proučavanje komponenata belanceta – proteina i njihove strukture koja je značajna za navedene karakteristike. U pogledu esencijalnih aminokiselina, proteini belanceta su najuravnoteženiji, pa su stoga i najkvalitetniji i služe za upoređivanje pri utvrđivanju hranjive vrednosti svih drugih proteina. Esencijalne aminokiseline koje su zastupljene su: lizin, treonin, valin, metionin, izoleucin, leucin, tirozin, fenilalanin.

2.1. Fizičko-hemijska svojstva proteina belanceta

Belance čini približno 60% ukupne mase jajeta, a voda i proteini su glavne sastavne komponente belanceta. Kao što je prikazano u Tabeli 2.1, proteini belanceta zauzimaju oko 10,52% ukupne mase belanceta, a ostatak belanceta čine voda i ugljeni hidrati i pepeo u tragovima, kao i vitamini i minerali [24]. Belance sadrži gotovo identičnu količinu kalijuma i natrijuma, minerala odgovornih za kreiranje elektrohemijškog gradijenta poznatog kao membranski potencijal. Membranski potencijal ima ključnu ulogu u kontrakciji mišića, prenosu nervnih impulsa, pravilnom radu srca, kao i prenosu nutrijenata i metabolita kroz ćeliju.

Tabela 2.1. Mineralni i vitaminski sastav proteina belanceta [25]

	Komponenta	Balance
	Voda	87,91
(g/100 g)	Proteini	10,52
	Ukupni lipidi	0,00
	Ugljeni hidrati	1,03
	Pepeo	0,64
	Kalcijum, Ca	6,00
	Gvožđe, Fe	0,03
Minerali	Magnezijum, Mg	11,0
(mg/100g)	Fosfor, P	13,0
	Kalijum, K	143,0
	Natrijum, Na	164,0
	Cink, Zn	0,01
	Askorbinska kiselina, C	0,00
	Tiamin, B₁	0,01
Vitamini	Riboflavin, B₂	0,45
(mg/100g)	Nikotinska kiselina	0,10
	Pantotenska kiselina	0,12
	Piridoksal, B₆	0,00

Većina proteina belanceta pripada globularnim proteinima. Pet glavnih proteina belanceta su ovalbumin, konalbumin, ovomukoid, ovomucin i lizozim, dok su ostali proteini zastupljeni u manjoj meri i to su: ovoglobulini G2 i G3, avidin, ovoinhibitor, cistatin, ovoglikoprotein, ovomakroglubulin i ovoflavoprotein (Tabela 2.2).

Tabela 2.2. Fizičko-hemijska svojstva proteina belanceta [26,27]

Proteini	Udeo%	pI	MM (kDa)	T_d (°C)	Svojstva
Ovalbumin	54	4,5	45	71,5-84	Fosfoglikoprotein, geliranje, penjenje
Ovotransferin (konalbumin)	13	6,1 - 6,6	76-80	57,3	Vezuje gvožđe i ostale metalne jone, antimikrobni protein
Ovomukoid	11	3,9 - 4,3	28	77	Inhibira serinske proteaze (tripsin), alergen
Ovomucin	3,5	4,5 - 5,0	110	n.o.	Glikoprotein, viskoznan, interaguje sa lizozimom, otporan na toplotu, odgovoran za dobro penjenje
Lizozim	3,4	10,7	14,3-14,6	81,5	Lizira čelijski zid nekih bakterija, antimikrobni protein
Ovoglobulini	8	5,5-5,8	30-49	92,5	Odgovorni za penjenje
Ovoflavoprotein	0,8	4,0 - 4,1	32-35	69-72	Vezuje riboflavin
Ovomakroglobulin	0,5	4,5 - 4,7	760-900	69-72	Glikoprotein
Ovoinhibitor	1,5	5,1 - 5,2	44-49	69-72	Inhibitor serinskih proteaza
Cistatin	0,05	5,1	12	-	Inhibitor proteaza
Ovoglikoprotein	1	3,9	24-24,4	69-72	Glikoprotein
Avidin	0,5	9,5 - 10,0	55- 68,3	n.o.	Vezuje biotin, antibakterijski agens

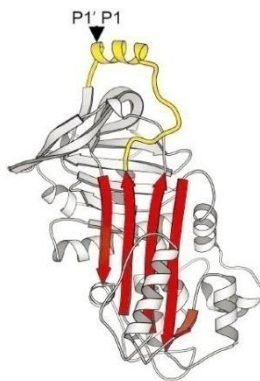
MM, molekulska masa; pI, izoelektrična tačka; T_d, temperatura denaturacije; n.o., nije određeno

2.1.1. Osnovni proteini belanceta

2.1.1.1. Ovalbumin

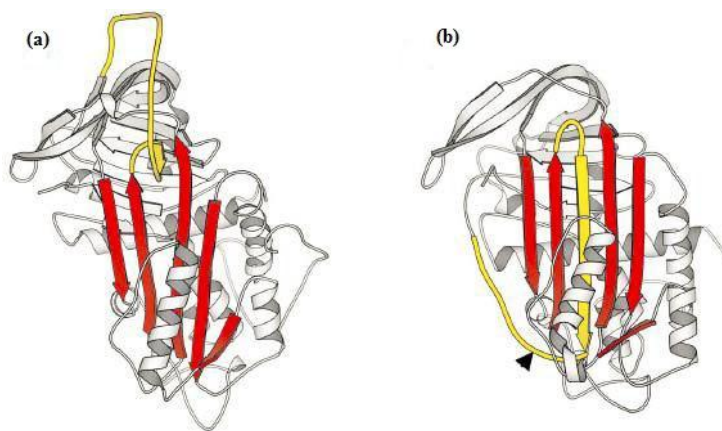
Ovalbumin je osnovni protein belanceta i ujedno i najzastupljeniji (54%). Po strukturi je monomerni fosfoglikoprotein molekulske mase 45 kDa, sa izoelektričnom tačkom 4,5 [19]. Kompletna aminokiselinska sekvenca koja obuhvata 385 aminokiselinskih ostataka i njegova kristalna struktura je već dokazana, a polovina aminokiselina koje ulaze u njegov sastav ima hidrofoban karakter [28]. Ovalbumin ima šest ostataka cisteina od kojih su dva uključena u formiranje disulfidne veze, pa se može zaključiti da ovalbumin poseduje četiri slobodne sulfhidrilne grupe i jedini je protein belanceta sa četiri sulfhidrilne grupe [29]. Podložan je denaturaciji prilikom izlaganja vazduhu i vodi ili ulju i vodi, a primećeno je i da lako koaguliše prilikom zagrevanja [19,30]. Prečišćen molekul se sastoji od tri komponente, A1, A2 i A3, koje sadrže dve, jednu i nijednu fosfatnu grupu po molekulu, redom. Formiranje termički stabilne forme ovalbumina, nazvane S-ovalbumin, tokom skladištenja jaja prvi su uočili Smit (Smith) i Bek (Back) (1965) [31]. Nisu primećene promene u aminokiselinskom sastavu ovalbumina i S-ovalbumina, ali je identifikovan intermedijar na temperaturi denaturacije od 88,5 °C (za S-ovalbumin ona iznosi 92,5 °C) čije je prisustvo potvrđeno skenirajućim kalorimetrijskim termogramom. Kato i sar. (1986) su utvrdili da kombinacijom alkalnog tretmana i skladištenja jaja dolazi do deamidacije ovalbumina [32].

Pregledom literature ustanovljeno je da ovalbumin ima značajnu ulogu prilikom određivanja funkcionalnih svojstava belanceta. N-terminalni krajevi ovalbumina su acetilovani i sadrže četiri sulfhidrilne grupe i jedan sulfidni most (Cys74-Cys121) koji su nedostupni u nativnom obliku [33,34]. Sekundarna struktura ovalbumina sastoji se od α -heliksa (41%), β -ravni (34%), β -zavojnice (12%) i nasumičnih namotaja (13%) [35]. Na Slici 2.2 prikazana je 3D struktura ovalbumina, na osnovu koje se može uočiti da je struktura veoma uređena i da se veoma lako uočavaju reaktivni α -heliks, koji izlazi iz osnove proteina pomoću dva peptidna lanca i glavne β -ravni. Reakcioni centar proteina smešten je na mestu-sekvenci Ala358-Ser359.



Slika 2.2. 3D kristalna struktura ovalbumina sa reaktivnim α -heliksom (žuto) i glavnom β -ravni (crveno) [36]

Aminokiselinski sastav i 3D struktura ovalbumina ukazuju na sličnost ovalbumina sa inhibitorima serin proteaza poznatim kao serpini, ali za razliku od njih ovalbumin nije inhibitor serin proteaza. Primarno objašnjenje zašto ovalbumin nije serpin jeste to da prilikom delovanja proteaza na ovalbumin ne dolazi do konformacionih promena u molekulu ovalbumina, do kojih dolazi pri delovanju serpina sa proteazama. Naime, kada serpin dođe u kontakt sa proteazom on se aktivira i nastupa konformaciona promena molekula pri čemu se reaktivna zavojnica - petlja centra (koja je u odnosu na ostatak molekula ispupčena) savija, iseca i ubacuje se u β -ravan (Slika 2.3). Zatim, u položaju P14 i P12 ovalbumin sadrži valin i alanin, redom, pa za razliku od serpina (treonin i alanin, redom), to onemogućava lako umetanje u β -ravan, a zbog gubitka fleksibilnosti molekula konformaciona promena je termički nepovoljna. Zbog navedenog, prilikom umetanja reakcione petlje (heliksa) dolazi do gubitka termičke stabilnosti za 1-2 °C [33, 36].



Slika 2.3. Kristalna struktura nativnog serpina (a) i aktiviranog serpina (b). Reaktivna zavojnica (petlja) centra proteina je žuto obojena [36]

2.1.1.2. Ovotransferin

Drugi je najzastupljeniji protein u belancetu sa molekulskom masom od 77,7 kDa i pI oko 6,1. Ovotransferin kokošijeg belanceta sadrži 686 aminokiselinskih ostataka, a njegova glikozilovana forma sadrži jednostruki lanac glukana na C-terminalnom domenu koji se sastoji od manoze i N-acetilglukozaminskih ostataka [3]. Ima 15 disulfidnih mostova, od kojih je šest locirano na N-terminalnom kraju, a ostalih devet na C-terminalnom kraju [27]. Spada u termolabilne proteine belanceta i na temperaturi od 60 °C može da dođe do njegove denaturacije [37].

Šed (Schade) i sar. (1944) su ustanovili da belance ima sposobnost fiksiranja gvožđa iz bakterijskog medijuma i to u tolikoj meri da ono postaje nedostupno mikroorganizmima, kao što je, na primer, kod *Shigella dysenteriae* za koju je gvožđe esencijalni faktor [38]. Verovalo se da je za ovo odgovoran neki protein iz belanceta zbog čega se pristupilo detaljnom istraživanju različitih proteina belanceta i njihovih frakcija. Rezultati do kojih se došlo su ukazivali na to da su gotovo svi proteini belanceta bili neaktivni, osim ovotransferina, koji je pokazivao 80% ukupne aktivnosti belanceta [39]. Naknadno je utvrđeno da i pseudo-globulin (ljudski krvni serum) pokazuje istu sposobnost vezivanja gvožđa kao i ovotransferin [40]. Ovaj protein je nazvan siderofilin [38-40]. Na osnovu određene 3D strukture, zaključeno je da se ovotransferin sastoji od dva homologna dela tzv. reznja (N-režanj i C-režanj), a da svaki od tih delova ima po dve oblasti - domena. Mesta na kojima se protein vezuje za jone gvožđa lokalizovana su između ovih domena i obuhvataju Asp63, Tyr95, Tyr188, His249, i Asp392, Tyr426, Tyr517, His585 u N- i C-režnjevima, respektivno [41]. Protein se vezivanjem jona metala stabilizuje usled povećanja temperature denaturacije sa 61 °C na oko 72 °C u slučaju vezivanja jona gvožđa [42]. Kompleks koji ovotransferin formira sa atomima gvožđa je losos-roze boje i otporan je na proteolitičku hidrolizu i termičku denaturaciju [38]. Intenzitet boje zavisi od prisustva kiseonika koji reaguje sa proteinom, koncentracije Fe^{3+} jona i prisustva karbonata. U odsustvu kiseonika stvara se žuto obojeni kompleks koji dodatkom askorbata prelazi u losos-roze boju [43,44].

Kao član familije transferina i metaloproteaza, ovotransferin je karakterističan po produkciji posebne grupe proteina za čiju sintezu je potreban određeni toplotni šok. Kada se ovi proteini sintetišu u koži, oni obezbeđuju zaštitu kože od hladnoće i drugih stresova [45].

Svaki domen sadrži tri disulfidne veze, dva ostatka tirozina i jedan aktivni centar. Pet ugljenohidratnih komponenti inhibitora koje su neesencijalne za njegovu inhibitornu aktivnost su povezane sa ostacima asparagina u Asp-X-Tir/Ser sekvencama [55]. Kod nekih molekula ovomukoida može se desiti da peti ostatak asparagina u III domenu ostane neglikozilovan. Mesto u proteinu označeno kao reaktivno mesto za funkciju tripsin inhibitora nalazi se u drugom domenu ovomukoida na sekvencama Arg89-Ala-90. Domeni I i II imaju u svojoj strukturi N-terminalni ugljenohidratni lanac, dok domen III može biti bez ugljenohidratnog lanca. Analizirajući gen za sintezu ovomukoida kokošijeg belanceta, naučnici su uočili da DNK sadrži dva introna (nukleotidna sekvencu unutar gena koja se uklanja putem RNK splajsovanja (modifikacija RNK nakon transkripcije) tokom formiranja finalnog RNK proizvoda) po domenu [56].

Ovomukoid može izazvati alergijske reakcije čak i kada je prisutan u veoma malim količinama. Ustanovljeno je da ni termički ni enzimski tretmani hidrolize ovog proteina ne mogu znatno uticati na njegov alergeni kapacitet. Visoka rezistentnost na termički i proteolitički tretman čine ovaj protein dobrim markerom za ispitivanje prisustva jaja u hrani, pa čak i u termički tretiranim proizvodima. Najčešće se kao tehnika testiranja na prisustvo proteina belanceta u hrani koriste ELISA testovi [53].

2.1.1.4. Ovomucin

Ovomucin je prvi put izolovao Ajkholc (Eichholz) (1898) i predstavlja glavni protein koji je odgovoran za gelirajuća svojstva belanceta [57]. Spada u glikoproteine i sastoji se iz tri subjedinice, $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - i β koje se razlikuju po molekularnoj masi i rastvorljivosti [58]. Metodom skenirajuće elektronske mikroskopije utvrđeno je da β -subjedinica poseduje citotoksični efekat na kultivisane ćelije raka i da inhibira rast tumorskih ćelija [43]. Odgovoran je za fizičko-hemijska svojstva belanceta, kao što su penjenje i emulgaciona sposobnost. Zahvaljujući svojim dugim proteinskim lancima umreženim sa oligosaharidnim jedinicama, ovomucin utiče na stabilnost pene belanceta. Ovomucin u svojoj nativnoj formi ima veliki značaj na stabilnost pene, jer smanjenje broja disulfidnih veza značajno utiče na smanjenje stabilnosti pene [59]. Nakamura i Sato (1964) su utvrdili da ovaj protein ima ulogu stabilizatora pene belanceta, dok su Kato i sar. (1985) potvrdili tezu da su hidrofobnost i fleksibilnost ovog proteina, kao i njegove uzajamne interakcije sa ostalim

proteinima belanceta, glavni razlog njegovih dobrih emulgirajućih svojstava [60,61]. Osim ovoga, dokazano je da ovomucin i njegovi hidrolizati poseduju određena bioaktivna svojstva (antivirusna, antimikrobna, antitumorna, imunomodulatorna), ali i mogućnost inhibicije apsorpcije holesterola zbog čega je upotreba ovomucina kao komponente funkcionalne hrane u sve većem porastu [62].

Slaba rastvorljivost ovomucina može biti redukovana dodatkom denaturanata i redukujućih supstanci, kao što su 2-merkaptoetanol (2-ME) ili 2-ME u kombinaciji sa ureom ili guanidijum-hidrohloridom [63]. Upotreba 2-merkaptoetanola ima negativan uticaj na sposobnost stvaranja pene i nije preporučljiv da se koristi u proizvodnji hrane. Još jedan od načina povećanja rastvorljivosti ovog proteina jeste sonikacija ili hidroliza različitim proteolitičkim enzimima, što će biti predmet ispitivanja ove teze [64]. Enzimskom hidrolizom dolazi do raskidanja peptidnih veza i oslobađanja peptida ili slobodnih aminokiselina. Uticaj enzimske hidrolize na svojstva penjenja ovomucina do sada nije objašnjen [59].

Upotreba ovog proteina kao komponente funkcionalne hrane do sada nije potpuno iskorišćena zbog neadekvatne industrijske metode ekstrakcije. Zbog relativno oskudnih podataka o svojstvima ovog proteina, potrebno je izvršiti detaljnije analize kako bi se u potpunosti iskoristio njegov potencijal. Za razliku od ostalih proteina belanceta koji su detaljnije i opširnije opisani u literaturi, Haajdenhovi (Hiidenhovi) (2007) je jedini koji se ovom temom pozabavio na sistematičan način. U knjizi je dat detaljan opis ovomucina uključujući njegovu strukturu, fizičko-hemijske karakteristike, metode dobijanja, prečišćavanja i njegova biološka svojstva [58,65].

2.1.1.5. Lizozim

Jedan od najviše proučavanih proteina belanceta i protein kome je prvo određena sekvenca je lizozim. Lizozim je mali protein koji se sastoji od 129 aminokiselinskih ostataka, molekulske mase oko 14,6 kDa i vrednosti izoeletrične tačke 10,7. Čini oko 3,4% ukupnih proteina belanceta. U belancetu se najčešće vezuje za ovomucin, ovalbumin ili ovotransferin. 3D struktura lizozima je određena i utvrđeno je da u molekulu postoje četiri disulfidna mosta i da nema slobodnih sulfhidrilnih grupa [66]. Molekul lizozima sastoji se od dva domena koji su povezani α -heliksom. Strukturu N-terminalnog domena uglavnom

sačinjava anti-paralelni β -naborani list i nekoliko α -zavojnica, dok strukturu drugog domena čine uglavnom α -zavojnice [66].

Posедуje sposobnost liziranja Gram-negativnih bakterija hidrolizujući $\beta(1\rightarrow4)$ veze između muraminske kiseline i N-acetilglukoamina mukopolisaharida u ćelijskom zidu bakterija. Glavnu ulogu u ovoj funkciji lizozima ima deo označen kao heliks - petlja - koji se nalazi između njegova dva domena na mestu Asp87-Arg114. Redukcijom više od dva disulfidna mosta u molekulu lizozima gubi se navedena bioaktivnost [66]. Međutim, redukcijom disulfidnih mostova poboljšavaju se funkcionalna svojstva belanceta, kao što su penjenje i geliranje [33]. Osim važne uloge u interakciji sa drugim proteinima tokom penjenja i geliranja, lizozim može uticati na razređivanje belanceta tokom stajanja usled elektrostatičkih interakcija sa ovomucinom iz belanceta [3]. U kiseloj sredini je veoma stabilan, a može podneti i dvominutno zagrevanje na 100 °C. Termička stabilnost lizozima se prepisuje prisustvu disulfidnih mostova u molekulu. Njegova enzimaska aktivnost može biti znatno poboljšana dodatkom određenih supstanci, kao što su: etilendiamintetraacetat (EDTA), butilparaben, tripolifosfati i drugi prirodni antimikrobni agensi [67].

U prirodi se nalazi u obliku monomera, ali može da gradi i reverzibilne dimere. Dimeri lizozima pokazuju terapijska, antivirusna i antiinflamatorna svojstva. Indukuje fagocitozu ćelija, podstiče sintezu imunoglobulina i na taj način utiče na imunološke procese. Takođe, ima značajan uticaj na sintezu interferona. Pokazuje antimikrobnu aktivnost prema ograničenom broju bakterija i gljiva. Lizozim ima čitav niz bioloških funkcija: poboljšava dejstvo antibiotika, direktno aktivira imune ćelije, poseduje anti-tumorno i antiinflamatorno dejstvo.

Upotreba lizozima u farmaceutskoj industriji se pre svega ogleda u sprečavanju bakterijskih, virusnih i inflamatornih infekcija, ali je i nezaobilazni sastojak mnogih terapijskih krema protiv opekotina i virusnih infekcija kože. Osim toga, bitno je napomenuti i njegovu primenu u tehnologiji proizvodnje sira i piva (kontrola mlečnih bakterija tokom fermentacije). Ipak, njegova najvažnija upotreba je to što se koristi kao antimikrobni agens u prehrambenoj industriji, a razlozi za ovo su sledeći: termički stabilan, aktivan u širokom temperaturnom opsegu (od 1 °C do skoro 100 °C), nedeaktivira se rastvaračima, zadržava svoju aktivnost i nakon ponovnog rastvaranja u vodi, stabilan je

tokom zamrzavanja, svoju optimalnu aktivnost pokazuje na pH 5,3-6,4, u prisustvu drugih proteina hrane može da redukuje svoju stabilnost formiranjem disulfidnih veza [43].

2.1.2. Manje zastupljeni proteini belanceta

2.1.2.1. Ovoglobulin

Ovoglobulin prisutan u belancetu je zastupljen u dve različite forme. Pre nekoliko decenija je otkriveno prisustvo tri globulina, G1, G2 i G3, ali je naknadno utvrđeno da je ovoglobulin G1 identifikovan kao lizozim i potpuno je okarakterisan. Nasuprot tome, veoma malo radova je objavljeno na temu globulina G2 i G3. Zajedno, ovoglobulin G2 i G3 čine oko 0,4% od ukupnih proteina prisutnih u belancetu, a analizom aminokiselinskog i ugljenohidratnog sastava (3,2-3,7% heksoza, 2,4-2,5% heksozamina) došlo se do zaključka da su G2 i G3 globulini veoma slični jedan drugom. Njihove molekulske mase variraju u opsegu od 30 do 49 kDa, sa izoelektričnim tačkama na pH 5,5 i 5,8, redom, za G2 i G3 [28]. Kako bi se ispitaio uticaj temperature na ovoglobuline, ove dve forme su razdvojene tehnikom elektroforeze i jonoizmenjivačkom hromatografijom i utvrđeno je da G3 forma pokazuje veću rezistentnost ka termičkoj denaturaciji, u odnosu na G2 ovoglobulin (92,5 °C) [20]. Uloga globulina još uvek nije dovoljno istražena, ali se zna da su oni odgovorni za sposobnost stvaranja pene belanceta [3].

2.1.2.2. Avidin

Avidin je otkriven 1920. godine, otprilike u isto vreme kada i vitamin biotin (vitamin B7). Po svojoj strukturi je tetramerni, pozitivno naelektrisan glikoprotein sastavljen iz četiri identične subjedinice koje sadrže 128 aminokiselina [68]. Ima sposobnost nekovalentnog vezivanja biotina i ova reakcija ima ireverzibilni karakter. Ukupno može da veže do četiri molekula biotina i na svakoj subjedinici se nalazi mesto za vezivanje biotina. Avidin - biotin kompleks je otporan na denaturaciju i stabilan je čak i na temperaturama od 100 °C, dok se sam avidin u svojoj nativnoj formi denuriše na 85 °C [20]. Kako bi se raskinula veza u ovom kompleksu, neophodno je zagrevanje na 120 °C u trajanju od 15 minuta. Sa biohemijskog aspekta ovakve interakcije su ponekad jako poželjne. Skoro četiri decenije se ove jake interakcije avidina sa biotinom, kao i interakcije njihovih konjugata, smatraju nezaobilaznim u mnogim biohemijskim i biotehnološkim procesima. Danas se ovakvi kompleksi jako često koriste u brojnim laboratorijskim tehnikama, uključujući

imunoprecipitaciju, afinitetno prečišćavanje, ELISA testove, tehnike koje se koriste za detektovanje specifičnih proteina u određenom uzorku (*na engl.* western blotting), tehnike razdvajanja ćelija na osnovu njihovih osobina (*na engl.* fluorescence-activated cell sorting, FACS) [69].

Otkrićem avidina i njegove biološke funkcije prvi put je uveden termin antivitamina koji može dovesti do razvoja određene bolesti iako su adekvatne količine posebnih vitamina prisutne u ljudskoj ishrani. Srećom, avidin se inaktivira zagrevanjem te stoga ne predstavlja problem prilikom konzumiranja jaja klasičnim postupkom pripreme u domaćinstvima [44]. Funkcionalni peptidi avidina još uvek nisu izolovani [70].

2.1.2.3. Ovoinhibitor

Ovoinhibitor čini 1,5% ukupnih proteina belanceta i spada u inhibitore serinskih proteaza. Po svojim karakteristikama sličan je ovomukoidu, ali ima veću molekulsku masu (50 kDa) koja obuhvata sedam domena od kojih svaki ima sličan raspored disulfidnih veza kao i ovomukoid. Šest domena pripada α -tipu, dok sedmi, koji se nalazi na C-terminalnom kraju ima karakteristike β -tipa. Pregledom literature pronađeno je da se denaturiše na temperaturama od 69 do 72 °C [26]. Takođe, ima sposobnost inhibicije tripsina, himotripsina, kao i bakterijskih (subtilizin) i gljivičnih proteaza (alkalne proteaze iz *Aspergillus oryzae*) [71]. Jedan molekul ovoinhibitora inhibira dva molekula tripsina i dva molekula himotripsina, od kojih se svaki vezuje za odgovarajući domen, dok se subtilizin i himotripsin vezuju za ista vezujuća mesta na domenu [72,73]. Zahvaljujući velikom broju domena, postoji mogućnost inhibicije širokog spektra proteaza što značajno utiče na prevenciju i zaštitu od mikroorganizama.

2.1.2.4. Cistatin

Cistatin se nalazi u jako malim koncentracijama u belancetu (oko 12,5 $\mu\text{g/ml}$) i zauzima 0,05% mase svih proteina prisutnih u belancetu [74]. Inhibira brojne cisteinske proteaze, kao što su: ficin, papain, katepsin B, katepsin H, katepsin L i dipeptidil peptidaze. Jako slabo utiče na inhibiciju bromelina. Postoje dve forme cistatina, označene kao A i B, imunološki su identične i ne sadrže ugljene hidrate [27]. Njegova trodimenzionalna struktura je određena pomoću kristalografije X-zracima pri rezoluciji od 2,0 Å i utvrđeno je da cistatin poseduje α -zavojnicu, pet lanaca β -naborane strukture i dva disulfidna mosta

unutar molekula [75]. Takođe, identifikovan je i region karakterističan za vezivanje proteaza.

2.1.2.5. Ovoglikoprotein i ovomakroglobulin

Ovoglikoprotein je glikoprotein koji zauzima 1% ukupnih proteina prisutnih u belancetu. Ima molekulsku masu oko 24 kDa i izolektričnu tačku na pH 3,9.

Drugi glikoprotein prisutan u belancetu jeste ovomakroglobulin koji učestvuje sa 0,5% u izgradnji svih proteina prisutnih u belancetu i smatra se drugim po veličini glikoproteinom belanceta posle ovomucina. Sastoji se iz četiri subjediniće povezane disulfidnim vezama, sa molekulskom masom između 760 i 900 kDa. Inhibira veliki broj endoproteaza, uključujući termolizin i kolagenazu [76]. Njegova struktura i mehanizam delovanja su skoro identični sa α -makroglobulinom (serumski inhibitor proteaza). Sličnost u homologiji sa α -makroglobulinom je 40%, ali za razliku od α -makroglobulina, ovomakroglobulin nije osetljiv na prisustvo metilamina, pa samim tim pokazuje različitu imunogenost [27]. Poznat je i pod nazivom ovostatin.

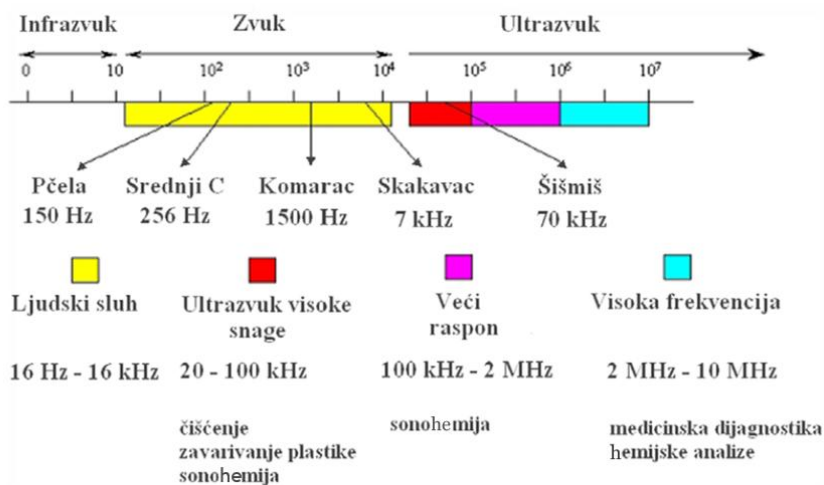
2.1.2.6. Ovoflavoprotein

Ovoflavoprotein, kao i avidin, pripada grupi vitamin vezujućih proteina. Predstavlja polipeptidni lanac sastavljen od 219 aminokiselinskih ostataka raspoređenih unutar dva strukturalna domena [77]. Veći domen (N-terminalni kraj) obuhvata prvih 170 aminokiselina, dok u sastav manjeg domena (C-terminalni kraj) ulaze aminokiselinski ostaci od 171-219 [78]. Ima sposobnost vezivanja riboflavina (vitamin B₂), a vezujuće mesto se nalazi u većem domenu. U sklopu njegove strukture nalazi se devet disulfidnih mostova koji imaju veliki značaj u održavanju stabilne strukture proteina, a takođe, utiču i na otpornost ovoflavoproteina ka visokim temperaturama [27]. Od ovih devet disulfidnih mostova, osam je locirano u domenu sa vezujućim mestom za biotin (veći domen), a poslednji disulfidni most povezuje veći i manji domen [77]. Niska izoelektrična tačka na pH 4,0-4,1 je posledica prisustva velikog broja fosfatnih grupa, kiselih aminokiselina i sialinske kiseline [27].

3. ULTRAZVUK

Zahtevi prehrambene industrije ka minimalnom procesiranju hrane doveli su do značajnog unapređenja tehnika obrade hrane, jer su dosadašnji načini procesiranja hrane (termički tretman na visokim temperaturama) uticali na smanjenje nutritivnih svojstava i narušavanje organoleptičkih karakteristika krajnjeg proizvoda. Povećanjem zahteva potrošača i nametanjem oštih propisa o zaštiti životne sredine, tradicionalni načini procesiranja hrane u prehrambenoj industriji su poslednjih decenija izgubili na značaju, čime se pružila prilika za uvođenje novih tehnologija. Novije metode prerade hrane su bazirane na korišćenju tehnologija čiji je glavni cilj zadržavanje hranljive vrednosti proizvoda i očuvanje senzornih svojstava [79]. Tehnologija ultrazvuka visokog intenziteta klasifikovala se kao jedna od brzih, obećavajućih, zelenih tehnologija koja u prehrambenoj industriji privlači sve veću pažnju u poslednje vreme [80]. Ultrazvuk je našao primenu u različitim oblastima prehrambene tehnologije, kao što su procesi kristalizacije, zamrzavanja, ekstrakcije, sušenja, filtracije, sterilizacije, emulzifikacije itd.

Osnova primena ultrazvuka u obradi hrane leži u činjenici da njegovim dejstvom može doći do promena u hemijskim, funkcionalnim i fizičkim osobinama tretiranih uzoraka, olakšavajući na taj način sam tehnološki proces proizvodnje [81]. U zavisnosti od frekvence, ultrazvučni talasi se mogu podeliti u više područja koja određuju njihovu potencijalnu primenu (Slika 3.1). Pri tome su za primenu u prehrambenoj industriji najznačajnije frekvence ultrazvuka veće od 20 kHz [82].



Slika 3.1. Područja podele zvuka prema frekvencama [83]

Ultrazvuk predstavlja mehanički talas u elastičnoj sredini frekvence iznad 20 kHz koje ljudsko uho ne može da čuje i može biti klasifikovan u dve kategorije: ultrazvuk sa niskom jačinom (visoka frekvencija - slaba snaga) i visokom jačinom (niska frekvencija - jaka snaga). Snaga ultrazvuka niske jačine je relativno mala (1 W/cm^2), sa opsegom frekvenci od 5-10 MHz i on se najčešće primenjuje u dijagnostičkoj analizi prehrambenih proizvoda. Nešto jača snaga karakteristična je za ultrazvuk visoke jačine ($10\text{-}1000 \text{ W/cm}^2$), kao i frekvencija od 20-100 kHz, pa kao takav on ima letalan efekat na mikroorganizme i primenjuje se kao tretman prilikom čuvanja hrane [84,85].

3.1. Mehanizam dejstva ultrazvučnih talasa

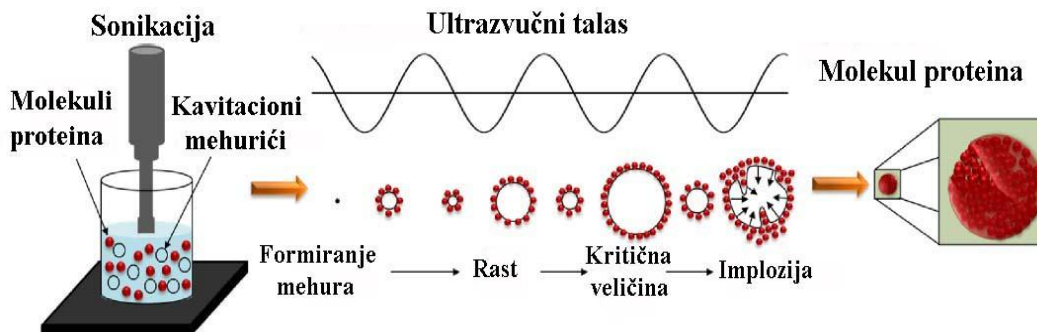
Ultrazvuk je definisan kao zvučni talas frekvence veće od 18-20 kHz. Prilikom prolaska ultrazvučnog talasa kroz tečni medijum, dolazi do pojave akustičnog pritiska, pored već postojećeg hidrostatičkog pritiska. Akustični pritisak (P_a) ultrazvučnog talasa se smatra sinusoidalnim talasom i zavisi od frekvence (f), vremena (t) i maksimalnog pritiska amplitude talasa ($P_{a, max}$) i definiše se sledećom jednačinom:

$$P_a = P_{a, max} \sin 2\pi f t \quad (3.1)$$

$P_{a, max}$ je direktno proporcionalan ulaznoj snazi transduktora [86]. Transduktor je uređaj koji vrši pretvaranje energije iz jednog oblika u drugi i proizvodi zvučne talase [87]. Pri niskom intenzitetu ultrazvuka, talas izazvan pritiskom dovodi do kretanja i mešanja unutar tečnosti, dok se pri visokim intenzitetima, zvučni talas prostire kroz tečni medijum stvarajući naizmeničnu kompresiju i ekspanziju ciklusa [88].

Ultrazvučni talas visoke jačine nastao periodičnim mehaničkim kretanjem sonde, vrši prenos ultrazvučne energije u reakcionom medijumu, izazivajući ekstremno jake promene pritiska koje dovode do formiranja mehurića koji imaju sposobnost da brzo rastu (kavitati) i da se šire ili smanjuju, usled fluktuacija pritiska, dovodeći do povećanja temperature (5000 K), pritiska (500 atm) i smicajnih sila unutar tretiranog medijuma [89-91]. Negativan pritisak tokom ciklusa dovodi do promena unutar tečnog medijuma koje prouzrokuju formiranje malih mehura ili kaviteta [92,93]. Tokom naknadne kompresije i ekspanzije ciklusa, mehurovi se spajaju i šire, što za posledicu ima povećanje veličine mehura tokom svakog narednog ultrazvučnog ciklusa (Slika 3.2). Nakon određenog broja ciklusa,

mehurići dostižu kritičnu veličinu unutar koje energija ultrazvuka nije u stanju da zadrži parnu fazu unutar mehura, pa dolazi do kondenzacije i implozije mehurića, a ovaj fenomen je poznat pod nazivom kavitacija [94].

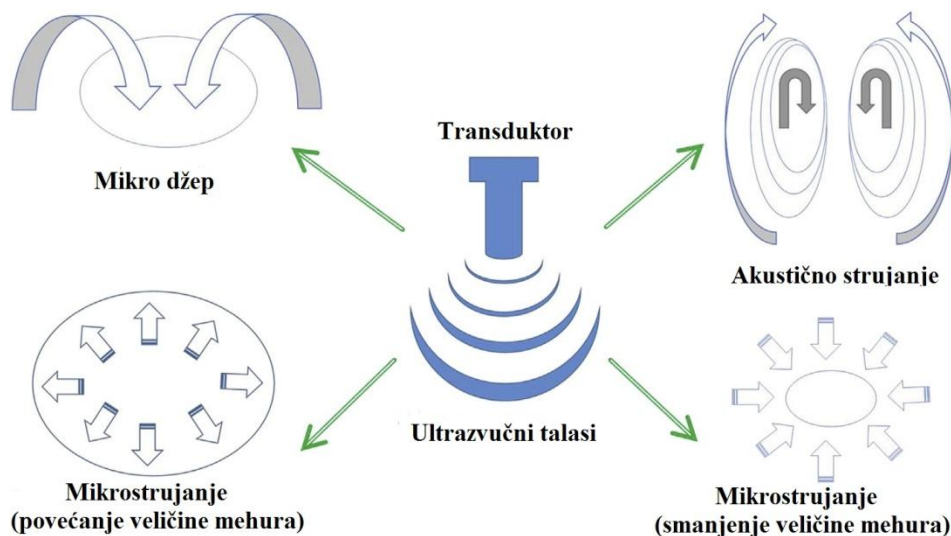


Slika 3.2. Formiranje kavitacionih mehura i uticaj kavitacije na molekul proteina [95]

Efikasnost kavitacije zavisi od frekvence i intenziteta ultrazvučnih talasa, kao i od fizičkih svojstava tretiranog medijuma. Povećanje frekvence ultrazvuka dovodi do stvaranja većeg broja kavitacionih mehurića manjeg prečnika, a količina oslobođenje energije tokom implozije mehura je minimalna (Slika 3.4b). Što se tiče fizičkih svojstava tretiranog medijuma, može se reći da je sonikacija čistih tečnosti izrazito otežana usled nemogućnosti ultrazvučnog generatora da proizvede dovoljno visok negativni pritisak koji dovodi do kavitacije. Sa druge strane, većina tečnih medijuma se ne smatra idealno čistim, jer sadrži veliki broj sitnih čestica, rastvorenih materija i nečistoća koje predstavljaju idealne tačke unutar tretiranog medijuma u kojima može doći do formiranja kavitacionih mehurova [96]. Na primer, kada se vrši sonikacija čiste vode, negativan pritisak veći od 0 atm je potreban da bi došlo do kavitacije, dok je za soniciranje vode iz česme dovoljan pritisak od samo nekoliko atmosfera za formiranje kaviteta [97].

Delovanjem ultrazvučnih talasa visokog intenziteta na tečni medijum dolazi do dinamičkog mešanja i smicajnih napona što dovodi do promene strukture tretiranog medijuma, a naročito utiče na viskoznost tečnih medijuma. Njutnovski fluidi obično zadržavaju svoju strukturu, dok dilatantni i tiksotropni fluidi postaju manje viskozni [98]. Ultrazvučni talas visokog intenziteta u fluidima male viskoznosti prouzrokuje snažno mešanje i oscilovanje koje dovodi do raspršivanja čestica. Na granici faza tečno/čvrsto ili gas/čvrsto, ultrazvučni talasi dovode do ekstremne turbulencije koja se naziva „akustično

strujanje“ ili „mikrostrujanje“ (Slika 3.3). Ova pojava značajno utiče na smanjenje difuzivnog sloja, kao i na povećan konvektivni prenos mase, pa dolazi do olakšane difuzije u medijumima gde uobičajno mešanje nije moguće [99]. Obrazovanje kaviteta je znatno složenije u medijumima velike gustine, viskoznosti i površinskog napona, dok su fluidi sa visokim naponom pare, malom viskoznošću i malim površinskim naponom skloni formiranju kaviteta [100].

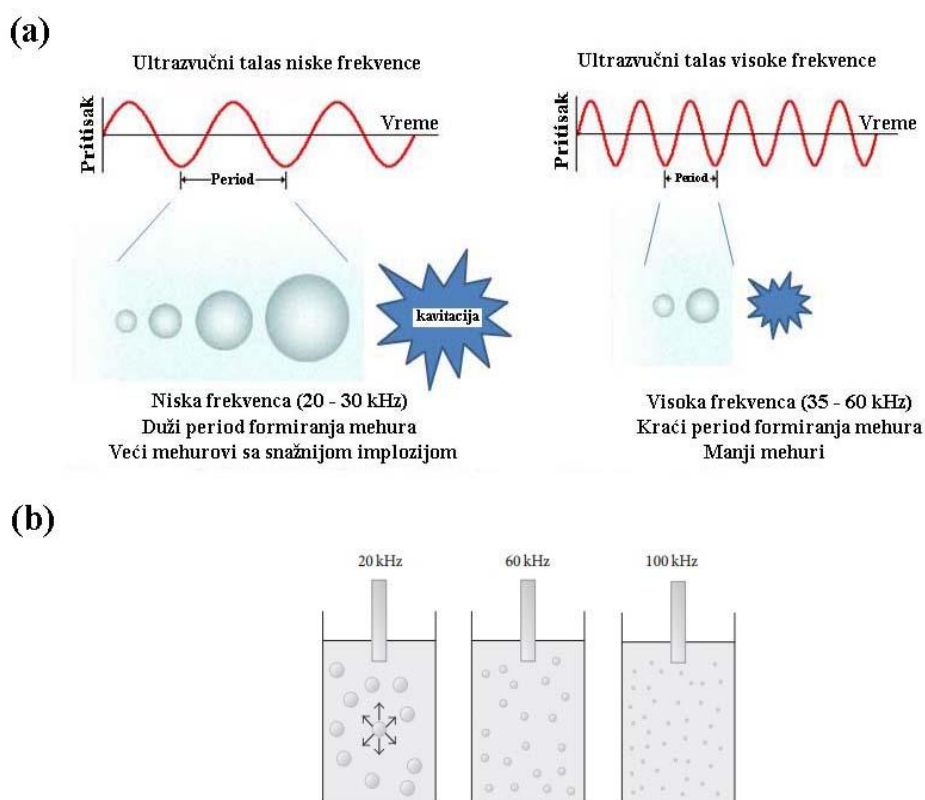


Slika 3.3. Mehanizam dejstva ultrazvučnih talasa unutar tretiranog fluida [101]

Implozija kavitacionih mehurića utiče na brojne fizičke, mehaničke i hemijske efekte usled stvaranja zona sa velikom turbulencijom (makro-turbulencija) i zbog velike brzine međučestičnih sudara. U fizičke efekte spadaju mikrostrujanje, formiranje mikro džepova (*na engl. micro-jet*) i udarni talasi, unutar kojih je strujanje fluida turbulentno, a kavitacioni mehuri dovode do stvaranja gradijenta brzine u mikro razmerama [102]. Takođe, poznato je da makro-turbulencija utiče na povećanje prenosa mase i toplote u mnogim procesima što dovodi do poboljšanja procesa ekstrakcije, desorpcije i mešanja [104]. Isto tako, veoma jake sile smicanja koje se javljaju mogu da raskinu i inter i intra-molekulske veze dovodeći do fragmentacije klastera i agregata [105]. Studije na kojima su radili Lorimer i Mason (1987) pokazuju da je frekvencija ultrazvuka obrnuto proporcionalna veličini mehura [106]. Dakle, ultrazvuk visoke jačine stvara veće kavitacione muhurove izazivajući povećanje temperature i pritiska u kavitacionoj zoni (Slika 3.4a). Sa povećanjem frekvence

kavitaciona zona postaje manje napadna i fenomen kavitacije se više ne uočava (MHz) [107].

Hemijski efekti kavitacije ogledaju se u formiranju reaktivnih slobodnih radikala, kao što su H^{\cdot} i OH^{\cdot} radikali koji mogu biti prednost ili nedostatak, zavisno od vrste procesa [108]. Formiranje hidrosil radikala (OH^{\cdot}) tokom kavitacije utiče na kvalitet pojedinih komponenata hrane. Studijom Ašokumara (Ashokkumar) i sar. (2008) utvrđeno je da nakon 4 h ultrazvučnog tretmana dolazi do smanjenja antioksidativne aktivnosti cijanidin-3-glukozida i zabeležena je pet puta manja aktivnost u odnosu na kontrolni uzorak (bez ultrazvučnog tretmana) [109]. Nasuprot ovom saznanju, postoje mnoge studije u kojima je utvrđeno poboljšanje funkcionalnosti sastojaka hrane zahvaljujući upravo prisustvu slobodnih radikala [93, 110-113].



Slika 3.4. Uticaj frekvence ultrazvuka na formiranje (a) i veličinu kavitacionih mehura (b)

[114]

3.2. Faktori koji utiču na kavitaciju

Frekvencija ultrazvučnih talasa: Poznato je da kavitacioni mehurići zahtevaju određeno i tačno definisano vreme za formiranje zona unutar kojih se formiraju mesta za nukleaciju. Upravo zbog ovoga, sa povećanjem frekvence ultrazvučnih talasa, skraćuje se period talasa sa niskim pritiskom i intenzitet ultrazvuka se povećava kako bi se održala ravnoteža kavitacione energije u sistemu. Na primer, period trajanja ekspanzionog ciklusa se smanjuje sa 25 μ s na 0,025 μ s kada se frekvencija ultrazvuka poveća sa 20 kHz na 20 MHz [115]. Visoka frekvencija dovodi do smanjenja kavitacionog efekta zbog dužine trajanja perioda negativnog pritiska karakterističnog za ciklus ekspanzije, koji nije dovoljan za iniciranje kavitacije unutar tretiranog medijuma, dok je formiranje ciklusa kompresije brže od vremena potrebnog za narušavanje kavitacionih mehurića [116]. Pri niskim frekvencama, javlja se intenzivnija kavitacija, koja za posledicu ima formiranje lokalnih zona unutar tretiranog medijuma sa veoma visokim temperaturama i pritiskom [96].

Intenzitet ultrazvučnih talasa: Intenzitet ultrazvuka predstavlja snagu emitovanu po jedinici površine sonotrode i definisan je kao W/cm^2 , a energija ultrazvuka se definiše kao integral emitovane snage u funkciji vremena [107]. Vreme emisije ultrazvučnih talasa je obrnuto proporcionalno protoku kroz ultrazvučni uređaj (l/h). Uopšteno, sa povećanjem intenziteta ultrazvučnih talasa, dolazi do povećanja amplitude talasa što za posledicu daje veoma snažnu imploziju kavitacionih mehura, a količina energije koja može biti emitovana unutar tretiranog medijuma je ograničena [115,116].

Karakteristike rastvarača: Kaviteti se lakše formiraju u rastvaračima sa visokim pritiskom pare, niskom viskoznošću i malim površinskim naponom [116]. Što je veći pritisak pare, implozija mehura će biti blaža zbog povećanog prodora veće količine pare unutar mehura [117]. Takođe, prag kavitacije raste sa povećanjem viskoznosti tretiranog medijuma. Jedan od načina povećanja viskoznosti jeste stalan porast temperature do određene granice koja bi omogućila snažnu imploziju kavitacionih mehurića. Ukoliko temperatura prekorači dozvoljeni opseg, dolazi do povećanja pritiska pare i narušavanja sonohemijskih efekata. Stoga, za svaki tretirani medijum postoji optimalna temperatura pri kojoj je viskoznost u granicama dozvoljene za postizanje intenzivne kavitacije.

Svojstva gasa: Rastvoreni gasovi i mehurići gasa prisutni unutar tretiranog tečnog medijuma deluju kao mesta nukleacije za obrazovanje kavitacionih mehura. Stoga se u svim procesima kod kojih je kavitacija osnovni faktor za uspostavljanje sonohemijskih efekata izbegava degasiranje, jer se smatra kontraproaktivnim. Prisustvo rastvornih gasova utiče na formiranje većeg broja kavitacionih jezgara. Takođe, velika rastvorljivost gasa dovodi do difuzije molekula gasa unutar kavitacionih mehurića, izazivajući na taj način manje intenzivnu imploziju [96]. Odnos toplotnih kapaciteta (C_p/C_v) ili politropski odnos (γ) i toplotna provodljivost gasa, utiču na količinu oslobođene toplote tokom implozije kavitacionih mehura [116,117].

Pritisak: Spoljašnji pritisak i pritisak pare rastvarača predstavljaju dva najbitnija faktora koja utiču na fenomen kavitacije. Sa povećanjem spoljašnjeg pritiska, dolazi do povećanja praga kavitacije rastvaranjem suspendovanih molekula gasa i na taj način se smanjuje broj kavitacionih mehura [118]. Ono što je još važnije napomenuti, jeste da, povećanjem spoljašnjeg pritiska dolazi do povećanja pritiska unutar kavitacionih mehurića, pa je samim tim energija koja se oslobodi tokom implozije mehura veća. Na ovaj način se ostvaruje efikasnija kavitacija [106]. Energija potrebna za kavitaciju u medijumima sa niskim pritiskom pare je relativno velika zbog smanjenog prenosa mase unutar kavitacionog mehura. Stoga, isparljiviji rastvarači imaju pozitivan uticaj na kavitaciju pri niskoj energiji ultrazvuka i dovode do stvaranja kavitacionih mehura ispunjenih parnom fazom.

Temperatura: Pritisak pare, površinski napon i viskoznost fluida su uslovljeni temperaturom fluida [118]. Povećanje temperature propagira kavitaciju i dovodi do obrazovanja većeg broja kavitacionih mehura pri niskom intenzitetu ultrazvuka. Međutim, sonohemijski efekti su smanjenji pri ovim uslovima, jer povećan broj kavitacionih mehura predstavlja barijeru za prenos ultrazvučnog talasa. Prema tome, kako bi sonohemijski efekat bio intenzivan, potrebno je soniciranje izvoditi na niskim temperaturama ili korišćenjem rastvarača sa niskim pritiskom pare. Studije kineskih autora pokazale su da ekstrakcija flavonoida iz bambusa može biti pospešena korišćenjem ultrazvučne ekstrakcije na niskim temperaturama, u poređenju sa ekstrakcijom flavonoida ostvarenom pomoću zagrejjane vode na 80 °C [119].

3.3. Primena ultrazvuka u prehrambenoj industriji

U svrhu odgovarajuće primene ultrazvuka u pojedinim granama kako prehrambene industrije tako i u drugim, važno je znati energiju koja je određena snagom ultrazvuka (W), intenzitetom (W/cm^2) i gustinom (Ws/m^3). Na osnovu prethodno definisane podele ultrazvuka na ultrazvuk niske jačine (visoka frekvenca - slaba snaga) i visoke jačine (niska frekvenca - jaka snaga), može se reći da se ultrazvuk niske snage ($1 W/cm^2, f = 5-10 MHz$) uspešno koristi za neinvazivnu detekciju (kontrolu procesa), za karakterizaciju fizičko-hemijskih svojstava materijala, stimulaciju aktivnosti živih ćelija, površinsko čišćenje hrane, ekstrakciju, kristalizaciju, filtraciju, sušenje i zamrzavanje, dok se ultrazvuk visoke snage ($10-1000 W/cm^2, f = 20-100 kHz$) uglavnom primenjuje za ekstrakciju enzima i proteina, indukovanje reakcija oksidacije i redukcije, inaktivaciju enzima, indukciju nukleacije kod kristalizacije, ubrzavanje reakcija itd (Slika 3.5) [120-127].



Slika 3.5. Primena ultrazvuka u prehrambenoj industriji

Jedna od najranijih upotreba ultrazvuka u prehrambenoj industriji i procesiranju hrane jeste prilikom emulzifikacije namirnica [123]. Stabilne emulzije stvorene dejstvom ultrazvuka našle su primenu u tekstilnoj, kozmetičkoj, farmaceutskoj i industriji hrane uopšte. Emulzije dobijene na ovaj način su obično stabilnije od konvencionalno proizvedenih i zahtevaju malo ili nimalo prisustvo površinski aktivnih supstanci. Takođe, ultrazvučno formirane emulzije, u poređenju sa emulzijama dobijenim putem drugih metoda, imaju manju veličinu kapljica i užu raspodelu čestica. Ultrazvuk se pokazao

delotvornim i tokom stvaranja kristala leda u procesima zamrzavanja vode, jer centri kristalizacije nastaju brže i jednoličnije [128]. Ovo utiče na skraćivanje vremena inicijacije kristalizacije i potpunog formiranja leda, čime se smanjuje oštećenje leda i stvaraju se mali intracelularni kristali leda. Postoje studije koje su pokazale da ultrazvuk utiče i na prenos toplote [129,130]. Biljna tkiva prisutna u voću i povrću poseduju čvrstu ćelijsku strukturu i time utiču na stvaranje manjeg otpora širenju kristala leda, te su podložna ireverzibilnom oštećenju prilikom procesa zamrzavanja. Na ovaj način dolazi do gubitka svojstava koja su odgovorna za očuvanje stabilnosti i svežine zamrznute hrane. Kako je očuvanje ćelijske strukture funkcija brzine zamrzavanja, brže zamrzavanje utiče na formiranje velikog broja malih kristala leda što rezultira manjim oštećenjem ćelijske strukture. Nasuprot tome, sporo zamrzavanje vodi do nastanka manjeg broja kristala leda koji su krupni, pa samim tim utiču na razaranje ćelijske strukture biljnih tkiva. Osim ovih primena, ultrazvuk visokog intenziteta je našao primenu i u ekstrakciji proteina povećavajući njihovu rastvorljivost i dovodeći do smanjenja njihove molekulske mase [131,132]. Zabeležena je i njegova primena u izolaciji skroba iz pirinča, pri čemu su obećavajući rezultati ostvareni soniciranjem uzorka u kratkim vremenskim intervalima [133]. Istovremeno, primena ultrazvuka uključuje ubrzavanje konvencionalnih reakcija razgradnje polimera i polimerizacije [134].

Tehnologija ultrazvuka visokog intenziteta je našla primenu i u inkapsulaciji terapijskih proteina, kao što su asparaginaza, insulin i eritropoetin, unutar biorazgradivih poli(D,L-laktid-ko-glikolid) mikročestica za kontrolisano otpuštanje *in vivo* [135,136]. Nedavno su objavljene i mnoge studije o uticaju ultrazvuka na konformacione promene molekula proteina koje se smatraju glavnim uzročnicima Alchajmerove i Hantingtonove bolesti [137]. Soto i sar. (2001) su pronašli novu metodu baziranu na cikličnoj amplifikaciji pogrešno uvijenih proteina (*na engl.* protein misfolding cyclic amplification) kao moguću za rano dijagnosticiranje poremećaja biosinteze priona [138]. Metoda se zasniva na vrlo preciznoj detekciji prionskih agregata posredstvom ultrazvučnih ciklusa (razaranje agregata na manje subjedinice) koji su praćeni naknadnim periodima inkubacije u kojima mali agregati deluju kao jezgra za formiranje novih agregata iz rastvorenog prionskog proteina.

Pregledom literature izdvojeni su različiti primeri primene ultrazvuka u prehrambenoj industriji, a njihov popis dat je u Tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Pregled efekata ultrazvuka u različitim tretmanima

Supstrat	Tretman	Uticaj ultrazvuka	Izvor
Lipaze Proteaze	20 kHz, 350–600 kPa, 110–140 °C, 60–150 µm fosfatni pufer (pH 5,5–8,0)	Smanjena aktivnost oba enzima; Uticaj amplitude zavisna od temperature; Dezaktivacija lipaze manotermosonikacijom zavisna od pH	[139]
Lizozim iz belanceta	20 kHz, 50–80 °C, 200 kPa, 117 µm fosfatni pufer (pH 6,2)	Smanjena aktivnost 10 puta; Gubitak katalitičke aktivnosti; Pojava slobodnih sulfhidrilnih grupa	[140]
Govedina	20 kHz, 150 W i 300 W 30 i 120 min	Povećan kapacitet vezivanja vode; Poboljšana mekoća mesa	[141]
Jabuke (<i>Malus Granny Smith</i>)	40kHz 131,3–0,23W/cm ² 120 s na 0 °C ili na -1 °C u etilenu glikol:voda (1:1)	Značajno unapređena brzina zamrzavanja; Indukovana primarna nukleacija	[142]
α-laktalbumin (10%-tni)	20 kHz/39–44 W/cm ² , 15 i 30 min na 4–8 °C	Poboljšana rastvorljivost; Smanjena molekulska masa proteina; Unapređena svojstva penjenja	[143]
Protein soje (10%-tni)	20 kHz/75–83 W/cm ² , 105–110 W/cm ² i 131–138 W/cm ² , 10–30 min	Povećan sadržaj slobodnih SH grupa; Povećana površinska hidrofobnost i rastvorljivost proteina; Smanjene međumolekulske interakcije	[144]
Pileće grudi i gelovi na bazi soje	20 kHz/450W, 0, 3, 6, 9 i 12 min, na 4–8 °C	Dobijen viskoelastični gel; Homogena mikrostruktura	[145]
Lignje (<i>Dosidicus gigas</i>)	20–140 kHz/45–360 W, 10–50 min na 20 °C	Neznatna promena pH; Smanjenje senzornih svojstava; Poboljšan kapacitet vezivanja vode; Povećana fleksibilnost i smanjena tvrdoća	[146]
Jagode	40 kHz 350 W/1, 10 min	Smanjen sadržaj mezofilnih mikroorganizama, plesni i kvasaca	[147]
Čeri paradajz	45 kHz, 10 min, 25 °C UZ*+ persirćetna kiselina (40 mg/l)	Smanjen sadržaj <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	[148]

3.4. Fizičko-hemijske promene proteina izazvane ultrazvučnim talasima

Na osnovu dostupne literature, uviđa se prisustvo velikog broja radova koji su se bavili uticajem ultrazvučnog tretmana na fizičko-hemijske promene proteina, pa se može zaključiti da je ova tematika postala predmet opsežnih naučnih istraživanja prethodnih godina (Tabela 3.1).

Ultrazvučni tretman se pokazao kao efikasan izbor za poboljšanje rastvorljivosti proteinskih formulacija u formi prahova, u poređenju sa drugim konvencionalnim i često korišćenim tehnikama, kao što je npr. intenzivno mešanje karakteristično po jakim smicajnim silama [149,150]. Sinergistički efekat hidrostatičkog pritiska i ultrazvučne kavitacije se smatra odgovornim za razaranje aglomerata proteinskih prahova i na ovaj način dolazi do povećanja stepena rastvorljivosti. U odnosu na konvencionalno mešanje ili homogenizaciju visokim pritiskom, koja se često koristi za povećanje rastvorljivosti proteina mleka sa visokim sadržajem micelnog kazeina, tehnika ultrazvuka se smatra boljim izborom [149].

Štaviše, pokazano je da ultrazvučni talasi utiču na smanjenje veličine agregata kazeina u vodenom rastvoru, što je posledica prisustva jakih smicajnih sila unutar tečnog medijuma izazvanih ultrazvučnom kavitacijom [150-153]. Utvrđeno je da produženo dejstvo ultrazvuka utiče na povećanje veličine agregata nastalih u međusobnim interakcijama proteina surutke ili kazein-surutka interakcijama [150,153]. Povećanje temperature tokom ultrazvučnog tretmana se smatra odgovornim za formiranje ovih agregata. Istraživanja druge grupe autora su se, takođe, bavila uticajem ultrazvučnog tretmana na veličinu agregata proteina surutke (suspenzija, koncentrat, izolati, retentat) i utvrđeno je da usled raskidanja nekovalentnih interakcija (vodonične veze, hidrofobne i elektrostatičke interakcije) dolazi do smanjenja veličine agregata proteina surutke [154,155]. Isto tako, utvrđeno je da povećanje temperature tokom ultrazvučnog tretmana goveđeg seruma albumina dovodi do povećanja veličine čestica [156]. Jedna grupa autora bavila se uticajem ultrazvuka na strukturu obezmašćenih proteina pšeničnih klica, kao i na njihove hidrolizate dobijene dejstvom enzima alkalaze i došli su do zaključka da su netretirani uzorci nepravilnog oblika čiji prečnici variraju u opsegu od nekoliko mikrona do 20 μm , a da su tretirani uzorci (20 min - 20 kHz) manjih dimenzija i da njihov maksimalni prečnik iznosi 10 μm . Formiranje agregata je posledica formiranja nekovalentnih interakcija između molekula proteina, pre svega elektrostatičkih i hidrofobnih, a dejstvom ultrazvuka dolazi do narušavanja tih interakcija i razgradnje molekula proteina na manje fragmente. Takođe, SEM analizom je potvrđeno da hidrolizovani uzorci nakon ultrazvučnog tretmana postaju „labaviji“ nego netretirani, što je objašnjeno time da ultrazvuk narušava strukturu agregata olakšavajući

alkalazi prilaz unutar agregata koji se manifestuje oslobađanjem hidrofobnih aminokiselina iz unutrašnjosti molekula proteina [157].

U skladu sa prethodnim stavkama, ultrazvučni tretman proteina mahunarki (proteini soje, graška, pasulja) i proteina pšeničnog glutena je, takođe, uticao na smanjenje veličine proteinskih agregata, dok je ultrazvučni tretman proteina belanceta pokazao suprotan učinak na veličinu čestica proteina belanceta [158-163]. Povećanje čestica proteina belanceta nakon ultrazvučnog tretmana pripisano je denaturaciji proteina izazvanoj povećanjem temperature tretiranog medijuma tokom trajanja ultrazvučnog tretmana. Sa druge strane, sonikacija izolata proteina riže nije značajno uticala na promenu veličine čestica, što je objašnjeno nedovoljnom količinom emitovane akustične energije za raskidanje disulfidnih veza odgovornih za održavanje strukture agregata [160]. Stoga, može se zaključiti da je promena veličine agregata proteina prouzrokovana ultrazvučnim talasima posledica raskidanja nekovalentnih interakcija koje su odgovorne za održavanje stabilne strukture agregata proteina u vodenim rastvorima.

Što se tiče uticaja ultrazvučnih talasa na primarnu strukturu proteina, pokazano je da ne dolazi do promene primarne strukture velikog broja proteina, uključujući koncentrat proteina mleka, suspenziju proteina surutke, pšenični gluten, izolat proteina crnog pasulja, želatin i proteine belanceta [144,151,159,161]. Na osnovu ovoga, može se konstatovati da energija ultrazvuka nije dovoljna da dovede do raskidanja peptidne veze i utiče na promenu aminokiselinskih sekvenci unutar proteina. Studije Kris-a (2011) su pokazale male izmene u raspodeli molekulske mase proteina belanceta nakon ultrazvučnog tretmana, što je objašnjeno raskidanjem disulfidnih veza između ostataka cisteina u belancetu [163]. Ovo je logično objašnjenje, jer se zna da je energija disulfidne veze mnogo manja u odnosu na energiju peptidne veze koja je zaslužna za održavanje primarne strukture proteina (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Energija hemijskih veza prisutnih u molekulima proteina [164]

Tipične hemijske veze prisutne u proteinima		Energija veze (kJ/mol)
Veze unutar peptidnih lanaca	C-N (peptidna veza)	285
	C=N	615
	C-C	348
	N-H	391
	C-H	413
	C=O	799
Međumolekulske veze između aminokiselina	Vodonična veza	4-13
	S-S	226

Generalno, može se pre reći da se energijom ultrazvuka više podstiče raskidanje nekovalentnih interakcija, nego raskidanje kovalentnih veza. Ipak, studije Jambrakove i sar. (2010, 2014) su pokazale da dolazi do značajnog smanjenja molekulske mase α -laktalbumina i proteina surutke (koncentrat/izolat) nakon primene ultrazvučnog tretmana, što nije u saglasnosti sa ostalim dostupnim literaturnim podacima iz ove tematike [143,155].

Kada je u pitanju viskoznost proteina, pokazano je da primenom ultrazvučnog tretmana dolazi do smanjenja viskoznosti kalcijum-kazeinata, koncentrata proteina mleka, retentata proteina surutke, izolata proteina soje i proteina belanceta, dok kod α -laktalbumina i obranog mleka u prahu nisu primećene značajne promene viskoznosti [143,144,151-153,162]. Smanjena viskoznost je posledica smanjenja veličine agregata proteina usled ultrazvučne kavitacije. Prostorno rastojanje između susednih agregata proteina se povećava nakon smanjenja veličine agregata dejstvom ultrazvučnih talasa, što utiče na povećanje koncentracije proteina dovodeći direktno do smanjenja viskoznosti rastvora proteina.

Nezaobilazno je navesti i značajna unapređenja emulgacionih svojstava koncentrata proteina mleka, izolata proteina mleka, proteina goveđeg želatina, izolata proteina soje, izolata proteina graška, proteina pšeničnog glutena i proteina oraha [151,160,161, 165,166,167]. Uticaj ultrazvuka na olakšano stvaranje emulzija i njihovu poboljšanu stabilnost ogleda se u povećanju hidrofobnosti molekula proteina i izlaganju hidrofobnih grupa unutar molekula proteina ka rastvaraču nakon ultrazvučnog tretmana. Takođe,

pregledom literature pronađeno je da je nakon soniciranja proteina surutke, soje i crnog pasulja došlo do povećanja hidrofobnosti i brzine adsorpcije proteina na graničnoj površini ulje-voda, što je detektovano merenjem površinskog napona [159]. Jedna grupa autora radila je istraživanja sa proteinima goveđeg želatina i tehnikom vizualizacije strukture pomoću SEM analize na izrazitoj niskoj temperaturi (*na engl.* cryo-SEM), utvrdili su postojanje različite morfologije kod ultrazvučno tretiranog želatina, u odnosu na netretirani kontrolni želatin [160]. Smanjena veličina vlakana želatina nakon ultrazvučnog tretmana uticala je na formiranje stabilnijih emulzija.

Danđun (Yanjun) i sar. (2014) su se bavili ispitivanjem uticaja ultrazvuka na površinsku hidrofobnost i rastvorljivost koncentrata proteina mleka i dobijeni rezultati su pokazali da ultrazvučni pretretman indukuje „odmotavanje“ molekula proteina. Ovaj fenomen dovodi do izlaganja hidrofobnih grupa i regiona unutar molekula ka polarnijem okruženju [151]. Čandrapala (Chandrapala) i sar. (2011) su pokazali da površinska hidrofobnost koncentrata proteina surutke opada nakon više od 5 min soniciranja, usled formiranja proteinskih agregata koji štite hidrofobne regione molekula proteina [105]. Ovi delimično denaturisani proteini sa povećanom površinskom hidrofobnošću mogu prouzrokovati jako vezivanje i redukovati površinsku hidrofobnost. Takođe, rastvorljivost ovih proteina se povećava dejstvom ultrazvuka jačine 20 kHz u različitim vremenskim intervalima. Slični rezultati su dobijeni za izolate i koncentrate proteina soje. Povećanje rastvorljivosti koncentrata proteina mleka se može objasniti promenama u trodimenzionalnoj strukturi globularnih proteina koje dovode do povećanja broja naelektrisanih grupa (NH^{4+} , COO^-). U ovakvim uslovima povećavaju se interakcije između proteina i molekula vode zbog većih elektrostatičkih sila. Povećanje temperature nakon tretmana takođe povećava rastvorljivost, što je u skladu sa činjenicom da se rastvorljivost proteina generalno povećava na temperaturama između 40 i 50 °C [151].

Informacija dostupnih u literaturi na temu uticaja utrazvučnog tretmana na proteine belanceta (nativne i/ili hidrolizate) je jako malo. Upotreba proteina belanceta u prehrambenoj industriji je od jako velikog interesa, jer zbog jedinstvenog aminokiselinskog sastava oni spadaju u najkvalitetnije proteine hrane. Iako imaju odgovarajuću biološku vrednost i funkcionalna svojstva, njihova šira komercijalna primena kao proteinskih dodataka ishrani ograničena je zbog alergnosti, nedovoljne svarljivosti, termolabilnosti i

velike viskoznosti. Na osnovu pregleda literature i prethodne diskusije vezane za uticaj ultrazvuka na fizičko-hemijska svojstva proteina iz različitih izvora, tema ove doktorske disertacije je upravo potencijalna primena ultrazvuka u cilju poboljšanja tehnološko-funkcionalnih svojstava proteina belanceta i njegovih hidrolizata.

Tabela 3.3. Primeri uticaja ultrazvuka na fizičko-hemijska svojstva proteina

	Poreklo proteina	Referenca
Mleko i mlečni proizvodi	Kazein	[168]
	Natrijum-kazeinat	[165,169]
	Kalcijum-kazeinat	[152]
	Koncentrati i izolati proteina mleka i mleko u prahu	[149,150-153,165,170]
	Koncentrati i izolati proteina surutke (uključujući goveđi serum albumin i α -laktalbumin)	[89, 105,143,152,154-156,162,165,171-173]
Životinjsko	Belance	[37,160,162,163]
	Želatin (goveđi i riblji)	[160]
Žitarice	Izolat proteina riže	[160]
	Pšenični gluten	[161]
Mahunarke	Koncentrat i izolat proteina soje (uključujući sojine ljuspice)	[144,160,162,167,174,175]
	Izolat proteina graška	[160]
	Izolat proteina crnog pasulja	[159]
	Izolat proteina mung pasulja	[158]
Voće	Orah	[166]
	Kikiriki	[176,177]

3.5. Ramanova spektroskopija

Kako molekuli predstavljaju sisteme atoma koji su medjusobno povezani određenim silama, kao rezultat ovih elastičnih veza, moguće je oscilovanje atoma unutar molekula. Oscilovanja atoma i promene koje se dešavaju usled ovakvih kretanja opisana su vibracionim spektrima. Karakteristike ovih spektara zavise od mase atoma, njihovog geometrijskog uredjenja u molekulu, kao i od intenziteta sila koje povezuju ove atome. Kako svaka supstanca, odnosno molekul, poseduje svoje jedinstvene karakteristike, tako će se razlikovati njihovi vibracioni spektri. Korišćenjem Ramanove spektroskopije moguće je identifikovati vrstu nepoznatog molekula. Takodje, moguće je određivanje molekulske strukture i proračunavanje drugih karakteristika molekula iz njihovih vibracionih spektara. Zbog toga, danas ove vrste spektroskopije imaju veliku ulogu u nauci.

Ramanova spektroskopija je tehnika koja daje informacije o eventualnim strukturnim promenama proteina nastalim usled primene nekog pretretmana (termički, ultrazvučni, UV zračenje, visok pritisak). Osnovni principi Ramanove spektroskopije bazirani su na ekscitaciji elektrona koji se nalaze u orbitalama najbližim jezgru atoma i njihovim naknadnim vibracionim prelazima. Uopšteno govoreći, Ramanova spektroskopija temelji se na neelastičnom rasipanju elektromagnetnog zračenja usled njegove interakcije s vibracionim stanjima molekula [178]. Ekscitacija dovodi do prelaska elektrona u stanje sa većom energijom i to se postiže direktnim izlaganjem uzorka izvoru monohromatskog ili infracrvenog zračenja. Prelazak elektrona u stanje manje energije dovodi do emisije fotona. Ukoliko je energija pobuđenog zračenja dovoljna za prelaz između elektronskih stanja, pobuđeno zračenje se apsorbuje. Pri povratku u osnovno elektronsko stanje, osim gubitka energije otpuštanjem toplote, pojedini molekuli mogu emitovati zračenje. Razlika u frekvenci fotona i izvora svetlosti se detektuje i definisana je kao Ramanov pomeraj. Intenzitet rasute svetlosti u funkciji promene talasnog broja pomeraja daje Ramanov spektar, a promene intenziteta i izgleda Ramanovih pikova (vibraciona frekvenca) su posledica narušavanja strukture proteina i njihovih funkcionalnih grupa [179]. Na osnovu ovih podataka, dobija se uvid u promenu sekundarne strukture proteina. Bitno je naglasiti da su velike prednosti Ramanove spektroskopije mogućnost rada sa izrazito razblaženim uzorcima proteina, jer se zna da su proteini skloni agregaciji pri visokim koncentracijama [180,181].

Vibracije dozvoljene u Ramanovom spektru su one pri kojima dolazi do promene polarnosti molekula. Rejljevo rasejanje podrazumeva elastično rasipanje zračenja pri kom su frekvence pobuđenog i rasejanog zračenja jednake, dok je Ramanovo rasejanje neelastično, pri kom se frekvencija rasutog zračenja razlikuje od frekvence pobuđenog zračenja. Ukoliko se molekuli nakon pobuđivanja vraćaju u viši vibracioni nivo osnovnog elektronskog stanja, emitovani foton je manje frekvence od pobuđenog i ta pojava se naziva Stoksovo rasejanje. Fluorescencija kao način deaktivacije molekula iz pobuđenog u osnovno stanje vrlo često može da maskira Stoksovo rasejanje, te su stoga merenja proteina koji imaju sposobnost fluorescencije otežana. Pri anti-Stoksovom rasejanju frekvencija emitovanog fotona je veća od frekvence pobuđenog fotona, budući da se molekuli pobuđeni iz višeg vibracionog nivoa, vraćaju u niži vibracioni nivo osnovnog elektronskog stanja. Proces Ramanovog rasejanja manje je verovatan od elastičnog Rejljevog rasejanja, jer se tek jedan od 10^6 - 10^8 fotona neelastično rasejava. Takođe, prema Bolcmanovoj raspodeli, na sobnoj temperaturi je većina molekula u osnovnom elektronskom stanju, dok je vrlo mali broj molekula u pobuđenom stanju, odnosno višim nivoima osnovnog stanja. Ramanovo rasejanje koji se temelji na Stoksovom neelastičnom rasejanju smatra se verovatnijim od anti-Stoksovog rasejanja, na sobnoj temperaturi [182].

Potrebno je naglasiti da Ramanova spektroskopija ima posebne prednosti za detekciju promene strukture proteina i/ili drugih jedinjenja koja ulaze u sastav hrane, jer daje veoma slab signal za vodu, što je od značaja zbog prisustva vode u mnogim (i do 75%) prehrambenim namirnicama [183]. Nedavno su mnoga istraživanja bila usmerena na primenu vibracione spektroskopije u analizi različitih proteina hrane, uključujući mlečne proteine, kao i proteine ribe i mesa [183-185]. Što se tiče proteina belanceta, postoje studije koje su se bavile ispitivanjem uticaja termičkog tretmana i tretmana visokim pritiskom na pojedinačne proteine belanceta, kao što je ovalbumin. Ngarize i sar. (2004) su utvrdili da primenom termičkog i tretmana visokim pritiskom dolazi do promene unutar Amid III regiona albumena belanceta [186]. Ova promena je posledica izmenjene strukture β -naboranog lista. Detektovan je manji udeo strukture β -naboranog lista nakon tretmana visokim pritiskom. Ista grupa autora je, takođe, utvrdila da tretman pritiskom u intervalu od 400-600 MPa manje utiče na sadržaj disulfidnih veza proteina belanceta, u poređenju sa termičkim tretmanom belanceta [187]. Nasuprot ovim rezultatima, studije drugih

istraživača su pokazale da termički tretman čistog ovalbumina dovodi do povećanja strukture β -naboranog lista i smanjenje udela α -heliksa. Nakon tretmana visokim pritiskom, zabeležen je dvostruko veći udeo β -strukture, a zadržan je skoro isti odnos udela β -naboranog lista i α -heliksa. Isto tako, utvrđeno je da je denaturacija ovalbumina manje izražena nakon tretmana od 600 MPa, 20 min, u odnosu na termički tretman izveden na temperaturi od 90 °C tokom 30 min [35]. Ireverzibilne promene sekundarne strukture ovalbumina su detektovane i u studijama Smita (Smith) i sar. (2000). Tretman pritiskom većim od 400 MPa uticao je na smanjenje udela α -heliksa i povećanje udela β -strukture [188]. Ajameti (Iametti) i sar. (1998) su ustanovili da dodatak natrijum-hlorida rastvoru ovalbumina utiče na manje izmene sekundarne strukture, što je potvrđeno tehnikom cirkularnog dihroizma [34].

4. TEHNOLOŠKO-FUNKCIONALNA SVOJSTVA PROTEINA

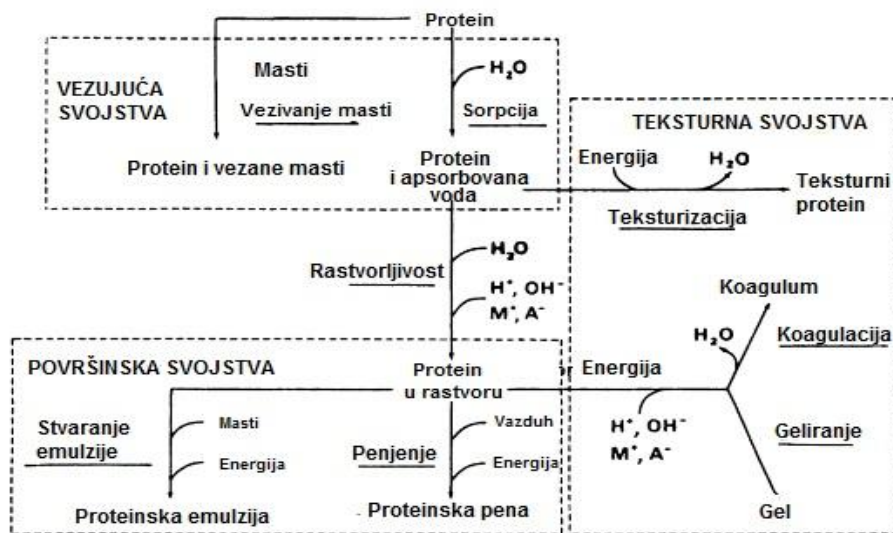
Po definiciji, tehnološko-funkcionalna svojstva (negde se navodi samo funkcionalna) predstavljaju fizičke i hemijske osobine proteina koje utiču na ponašanje istih u različitim sistemima tokom prerade, skladištenja, pripreme i upotrebe. U širem smislu, funkcionalnost predstavlja bilo koju sposobnost proteina (osim njegove hranljive vrednosti) koja utiče na njegovu primenu. Neka od najvažnijih funkcionalnih svojstava proteina data su Tabeli 4.1, dok su aspekti proteinske funkcionalnosti i međusobne veze prikazane na Slici 4.1.

Prema Hurelu (Hurrell) (1980), proteini spadaju u najreaktivnije molekule koji su prisutni u hrani. Mogu da reaguju sa mastima i njihovim oksidacionim proizvodima, polifenolima, redukujućim šećerima i mnogim drugim molekulima koji su prisutni u prehrambenim proizvodima. U ovim reakcijama dolazi do smanjenja njihove hranljive vrednosti, tamnjenja i formiranja različitih ukusa, a veoma često može doći i do pojave toksičnosti [189].

Tabela 4.1. Funkcionalna svojstva proteina hrane [190]

Svojstva	Funkcionalni kriterijum
Organoleptička	Ukus, miris, boja
Hidratacija	Rastvorljivost, apsorpcija vode, geliranje, viskoznost, zgušnjavanje, kvašenje, sinerezis
Površinska	Penjenje (aeracijom, mućenjem), emulgovanje, formiranje filma
Vezujuća	Vezivanje masti
Strukturna	Elastičnost, adhezija, agregacija, kohezivnost, umrežavanje, ugušćavanje, formiranje vlakana
Reološka	Viskoznost, geliranje, tekstura, zamućenost
Enzimska	Koagulacija (kod sirenja), omekšavanje (proteaze)
Blendirajuća	Komplementarnost (pšenica-soja, gluten-kazein)
Antioksidativna	Sprečavanje pojave arome (tečne emulzije)

Veoma je bitna i interakcija proteinskih molekula sa molekulima vode, što utiče na funkcionalne osobine kao što su viskoznost, geliranje, rastvorljivost, emulgovanje, reološke osobine (uključujući teksturna i senzorna svojstva) i ponašanje proteina kao surfaktanata. Rastvorljivost proteina je povezana sa njihovom funkcionalnošću i potencijalnom primenom. Inhibicija vode u proteinima je veoma značajna u mnogim prehrambenim proizvodima, jer prisustvo vode značajno utiče na viskoznost i zgušnjavanje. Efekat bubrenja varira u zavisnosti od vrste proteina, veličine proteinskih molekula, pH, jonske jačine rastvora i temperature. Proizvodi od mleka i soje se smatraju adekvatnim proteinskim aditivima koji se koriste za zadržavanje vode u hrani. Štaviše, dostupnost vode igra bitnu ulogu u procesu čuvanja hrane i utiče na hemijsku i mikrobiološku kontaminaciju hrane tokom skladištenja. Faktori kao što su priroda rastvarača, uslovi i metode ekstrakcije, priroda i koncentracija proteina, utiču na funkcionalne osobine ekstrahovanih proteina [189,191,192].



Slika 4.1. Aspekti proteinske funkcionalnosti i njihove međusobne veze [193]

Ne manje bitno svojstvo proteina je njihova sposobnost formiranja gela koji može biti u formi agregata ili u formi čistog gela [194]. Proteinski gelovi mogu biti formirani dodatkom soli, enzima, promenom pH vrednosti i zagrevanjem. Proces formiranja gela izazvan termičkim faktorom se odigrava kroz četiri faze: „odmotavanje“ proteina, vezivanje vode, protein-protein interakcije i tzv. „imobilizacijom vode“. Kad se protein izloži termičkom tretmanu, veze koje održavaju sekundarnu i tercijarnu strukturu počinju da slabe i na nekoj kritičnoj temperaturi se raskidaju (termička denaturacija). U početnoj fazi termičke denaturacije, većina proteina počinje da se odmotava. Ovo odmotavanje često dovodi do blagog povećanja količine vode vezane za protein. Ako protein-protein interakcije dovedu do formiranja trodimenzionalne mreže sposobne za zarobljavanje molekula vode, gel može da se formira. Ukoliko je mreža isuviše slaba, doći će do povećanja viskoznosti koje neće uticati na protok fluida i gel neće moći da se formira. Sa druge strane, ukoliko su protein-protein interakcije isuviše jake, može doći do narušavanja strukture trodimenzionalne mreže i izlaska molekula vode iz nje. Upravo je ravnoteža između privlačnih sila odgovornih za formiranje mreže i odbojnih sila neophodnih za održavanje njene strukture potrebna za proces formiranja gela [195,196]. Kazein i proteini belanceta formiraju gelove u formi agregata koji se odlikuju neprozirnošću zbog veoma velike razmere proteinskih agregata. Čisti gelovi se formiraju od manjih čestica (izolati proteina surutke) i imaju veliki kapacitet zadržavanja vode. Kod mnogih mlečnih proizvoda, formiranje gela je uslovljeno

dodatkom kiseline ili kombinovanom aktivnošću kiseline i odgovarajućeg enzima. Na primer, majonez predstavlja „ulje u vodi“ emulziju u kojoj se proteini žumanceta ponašaju kao emulgator. Prisustvo sirćetne kiseline u formi sirćeta ili limunske kiseline iz limunovog soka za posledicu ima stvaranje emulzije u formi gela, zbog toga što dolazi do interakcija koje se ogledaju prekrivanjem emulgujućih kapljica posredstvom proteina [197].

4.1. Stanja proteinskih molekula koja utiču na funkcionalnost proteina

4.1.1. Nativno stanje proteina

Promena uslova sredine dovodi do izmene u broju molekula proteina prisutnih u različitim specifičnim konformacijama, pa dolazi do izmene konformacije proteina koja se bitno razlikuje od njihove native konformacije. Uopšteno je poznato da molekuli proteina mogu biti u svom nativnom (prirodnom) stanju ili u denaturisanom stanju (razmotani). Nativno stanje proteina podrazumeva konformaciju prilagođenu standardnim uslovima sredine u kojoj se proteini nalaze, to jeste uslovima koji odgovaraju njihovom prirodnom okruženju. Denaturisano stanje je konformacija kojoj se proteini prilagođavaju kada dođe do delimičnog ili potpunog odmotavanja proteinskih lanaca, prilikom kog proteini teže obrazovanju fleksibilne konformacije nasumičnog klupka (*na engl.* random coil). Nedavne studije su pokazale da globularni proteini, među koje spadaju i proteini belanceta, mogu imati strukturne intermedijare (delimično uvijene) koji se formiraju između nativnog i denaturisanog stanja i koji su definisani kao stanje rastopljene globule (*na engl.* molten globule state) ili stanje delimično uređene konformacije [198].

4.1.2. Denaturisano stanje proteina

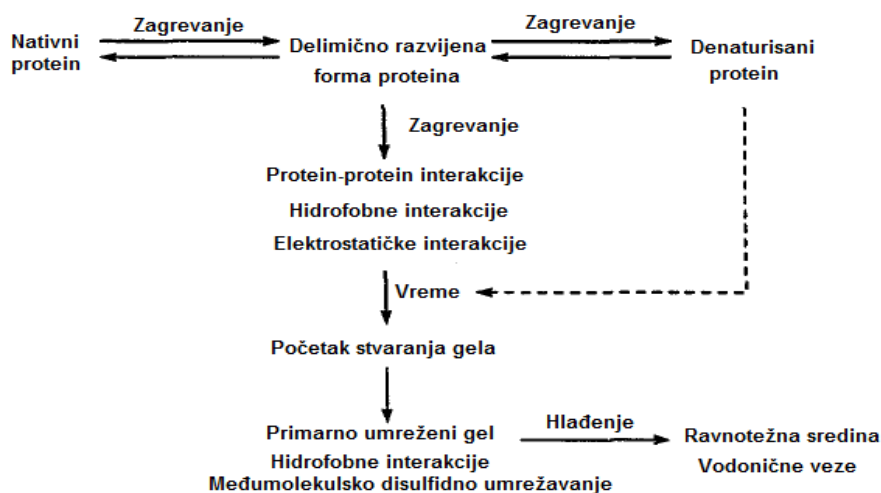
Funkcionalna svojstva proteina su uglavnom uslovljena promenom stanja proteina iz jednog u drugo. Na primer, proteini mogu pretrpeti prelaz iz uvijene forme u razvijenu konformaciju ili iz neadsorbovanog u adsorbovano stanje. U prvoj aproksimaciji, ovaj tip prelaza se može predstaviti kao ravnoteža između dve stanja [199]. Konformacija proteina na određenoj temperaturi zavisi od ravnoteže između faktora koji favorizuju nativno i denaturisano stanje. Ovi faktori uključuju hidrofobne interakcije, elektrostatičke interakcije, vodonične veze, Van der Valsove sile, sterne interakcije i konfiguracione efekte entropije [200,201]. Proteini zauzimaju ono kinetičko stanje koje se karakteriše nižom slobodnom

energijom pod dominantnim uslovima sredine. Smatra se da su glavni faktori koji utiču na stabilizaciju nativnog stanja globularnih proteina hidrofobni efekti. Molekuli teže da prilagode svoj položaj tako da im nepolarne aminokiseline budu locirane u unutrašnjosti, a polarne na spoljnoj strani molekula, prilikom čega se zauzima konformacija koja dovodi do minimalizacije nepoželjnih termodinamičkih hidrofobnih interakcija [202]. Najbitniji faktor koji favorizuje denaturisano stanje globularnih proteina jeste entropija konformacije molekula koja raste sa povećanjem temperature. Nakon povećanja temperature do određene granice, globularni proteini se razvijaju, jer su sile koje favorizuju denaturisano stanje (entropija konformacije) znatno veće od onih koje favorizuju nativno stanje proteina (hidrofobne interakcije).

Denaturacija izaziva bitne promene molekulske strukture i funkcionalnih svojstava proteina [42]. Nakon denaturacije, stabilnost proteina se narušava, a paralelno dolazi do povećanja hidrofobnosti molekula usled prisustva većeg broja nepolarnih aminokiselinskih ostataka iz unutrašnjosti molekula [203]. Kao posledica ovoga, određene hidrofobne grupe postaju više dostupne za razliku od sulfhidrilnih grupa čiji se broj smanjuje. Ovaj nastali "hidrofobni efekat" na nivou sekundarne strukture se ogleda u tome što dolazi do smanjenja udela α -heliksa, a povećanja udela β -naboranog lista. Promene sekundarne strukture kod proteina belanceta imaju veliki značaj na funkcionalna svojstva proteina belanceta, kao što su sposobnost stvaranja gela i rastvorljivost proteina. Denaturisani molekuli proteina su reaktivniji od netretiranih molekula zbog činjenice da kovalentne i nekovalentne interakcije mogu biti preraspoređene između susednih molekula pri odgovarajućim uslovima.

Evidentno je da brzina procesa denaturacije zavisi od unutrašnjih i spoljašnjih faktora. U unutrašnje faktore spadaju koncentracija i sastav proteina, dok su spoljašnji faktori temperatura i vreme zagrevanja, pH, jonska jačina i prisustvo određenih aditiva. Na primer, kompaktni proteini koji se sastoje iz nekoliko disulfidnih veza zahtevaju prilično veliku termičku energiju kako bi uopšte došlo do narušavanja njihove strukture. Sa druge strane, upravo zbog odsustva disulfidnih veza u molekulu konalbumina (protein belanceta), on se smatra izrazito termolabilnim proteinom za čiju denaturaciju nisu potrebne visoke temperature. U poređenju sa drugim proteinima belanceta, konalbumin postaje nerastvoran na znatno nižim temperaturama te stoga ovo predstavlja limitirajući faktor pri termičkom tretmanu belanceta [26,191,197]. Termički tretman se smatra jednom od najvažnijih

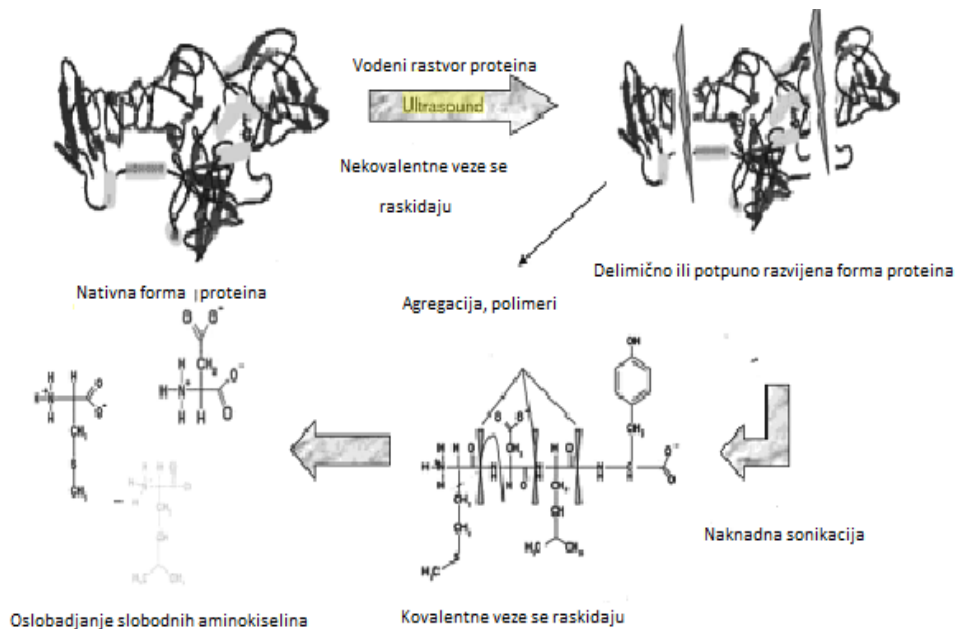
procesnih tehnika koje se koriste prilikom procesiranja hrane u čiji sastav ulaze globularni proteini. Primeri termičkih tretmana koji se koriste u prehrambenoj industriji su, na primer, pasterizacija, sterilizacija, kuvanje, zamrzavanje, hlađenje [204]. Mnogi globularni proteini se denaturišu dejstvom temperature, pri čemu povećanje temperature dovodi do olakšanog kretanja molekula što za posledicu ima raskidanje vodoničnih veza. Ukoliko se desi da se neke vodonične veze raskinu, struktura proteina (na primer α -heliks) će biti narušena i oslabljena, pa će se preostale vodonične veze lakše raskinuti. Denaturacija proteina povećanjem temperature je proces koji počinje gotovo neočekivano na tačno definisanoj kritičnoj temperaturi, a završava se na temperaturi koja je neznatno veća od kritične. Na primer, ljudsko telo ne može da podnese temperaturu veću od 42 °C zbog toga što ključni proteini gube svoju funkciju [205,206]. Na Slici 4.2. prikazano je termički indukovano geliranje proteina belanceta izazvano povećanjem temperature i denaturacijom proteina.



Slika 4.2. Šematski prikaz termički indukovano geliranja proteina belanceta [3]

Osim termičkog tretmana, na denaturaciju proteina značajan uticaj imaju i pretretman visokim pritiskom, dehidracija, snažno mešanje i homogenizacija, kao i primena ultrazvučnih talasa. Uticaj ultrazvuka na strukturalna i funkcionalna svojstva proteina belanceta je veoma malo izučavan. Kao što je već napomenuto, funkcionalna svojstva proteina uslovljena su njihovom molekulskom strukturom koja je posledica inter- i intramolekulskih interakcija kao što su kovalentne i nekovalentne veze. Strukturalna, a samim tim i funkcionalna svojstva proteina mogu biti promenjena hemijskim ili enzimskim reakcijama od kojih su najčešće reakcije oksidacije, glikozilacije, fosforilacije, zatim, reakcije

metilovanja i acilovanja. Efikasnost ovih reakcija zavisi od temperature samog procesa i primene mehaničkih sila kao što su visok pritisak ili smicanje [156]. Što se tiče molekula proteina, promene njihovih funkcionalnih svojstava dejstvom ultrazvuka zavise od jačine ultrazvučnih talasa, dužine ultrazvučnog pretretmana i uslova sredine u kojoj se izvodi reakcija (temperatura, pritisak, pH rastvora i jonska jačina). Ove promene su posledica intenzivnih modifikacija na nivou sekundarne i tercijarne strukture samih molekula proteina (Slika 4.3). Neophodno je napomenuti da je nekada poželjno da se struktura proteinskih molekula bitno naruši, kao što je to slučaj kod inaktivacije enzima i uklanjanja gorkog ukusa pojedinih peptida. Dejstvom ultrazvučnih talasa se između ostalog utiče i na brzinu adsorpcije, aktivnost enzima, brzinu geliranja molekula proteina kao i na stabilnost pene [207].



Slika 4.3. Šematski prikaz dejstva ultrazvuka na molekule proteina [207]

4.1.3. Stanje rastopljene globule (stanje delimično uređene konformacije)

Stanje delimično uređene strukture, poznato pod nazivom stanje rastopljene globule (*na engl.* molten globule state) predstavlja prelazno stanje između nativnog i denaturisanog stanja proteina. Upostavlja se u stanju ravnoteže između ova dva stanja, a u nekim proteinima se javlja i kao kinetički intermedijar prilikom ponovnog uvijanja molekula proteina (*na engl.* refolding). Ovo stanje se javlja pri blagim uslovima denaturacije proteina, kao što su umereno niske ili visoke pH vrednosti, visoka temperatura ili pritisak,

kao i prisustvo uree i gaunidijum hidrohlorida u manjim koncentracijama. Konformacija proteina karakteristična za ovo stanje je skoro isto kompaktna kao i nativna konformacija, a poseduje i labavo uvijeno nepolarano jezgro [208]. Tehnikom cirkularnog dihiroizma (daleki UV spektar) utvrđeno je postojanje izrazite sekundarne strukture proteina [209]. Pregledom literature utvrđeno je da je sekundarna struktura mnogih proteina u stanju rastopljene globule gotovo identična strukturi nativnog stanja i zabeleženi su gotovo isti udeli α -heliksa i β -naborane strukture [210-212].

Nasuprot ovome, prelaz molekula iz nativnog stanja u stanje delimično uređene konformacije karakteriše se strukturnim promenama unutar tercijarne strukture, što je detektovano gubitkom CD signala u bliskom UV regionu [209]. Objavljene studije su pokazale da dolazi do povećanja stope adsorpcije na granici faza vazduh - voda kod α -laktalbumina u stanju rastopljene globule, u poređenju sa stopom adsorpcije nativnog α -laktalbumina [210]. Uočili su, takođe, da je došlo do razaranja tercijarne strukture, dok je sekundarna struktura ostala očuvana. Značajne promene unutar tercijarne strukture su detektovane i za kokišiji lizozim tehnikama cirkularnog dihiroizma i nuklearne magnetne rezonance [213].

4.2. Funkcionalna svojstva proteina belanceta

U cilju optimizacije korišćenja proteina belanceta u prehrambenoj industriji, neophodno je dobro poznavanje njihovih funkcionalnih svojstava, jer ona zajedno sa nutritivnom vrednošću i senzornim karakteristikama predstavljaju ključni parametar za kvalitet i prihvatanje krajnje formulacije proizvoda za širu primenu i konzumiranje od strane potrošača. Kao što je napomenuto na početku ovog poglavlja, funkcionalna svojstva proteina zavise od uslova sredine kao što su pH, temperatura i jonska jačina. Zbog nedovoljnog broja objavljenih studija vezanih za uticaj nekog od ovih faktora na funkcionalnost proteina belanceta, ovde će biti reči o pronađenim studijama koje se odnose na funkcionalna svojstva proteina belanceta koja su najvažnija za njihovu primenu u prehrambenoj industriji.

4.2.1. Svojstva penjenja

Odlična svojstva belanceta ka sposobnosti stvaranja pene su posledica interakcija između proteina koji ulaze u njegov sastav. Osnovni preduslovi koje protein treba da

zadovoljava kako bi imao ovu sposobnost jeste da se brzo adsorbuje tokom procesa mućenja na graničnoj površini voda - vazduh, zatim da brzo menja svoju konformaciju i raspored funkcionalnih grupa na površini molekula, kao i da ima mogućnost formiranja kohezivnog viskozno - elastičnog filma pomoću intermolekulskih interakcija [3].

Tipična pena se sastoji od miliona mehurića inkapsuliranih pomoću proteinskog filma i odvojenih tankim kanalima ispunjenim vodom. Prema Belicu (Belitz) i sar. (2009) protein se tokom procesa stvaranja pene adsorbuje na površinu preko hidrofobnih regiona pri čemu dolazi do njegovog parcijalnog „odmotavanja“, a ova adsorpcija dovodi do smanjenja površinskog napona i olakšava formiranje pene [214]. Mehurići pene su stabilizovani duplim proteinskim slojem koji je odvojen kontinualnom fazom, tako da karakteristike ovog tankog filma određuju i samu stabilnost pene.

Mehanizam stvaranja pene je isti kao mehanizam formiranja emulzije. Sile koje su odgovorne za umetanje molekula vazduha unutar vodene faze su slične onima koji se stvaraju pri mešanju ulja i vode. U slučaju pene, molekuli vode okružuju kapljice vazduha. Molekuli vazduha su u suštini nepolarni, tako da organizacija i raspored molekula vode zavise od broja vazdušnih ćelija koje nastaju. To dovodi do visokog površinskog napona i površinske energije. Protein odgovoran za stvaranje pene mora biti u stanju da brzo difunduje sa granične površine i da zauzima takvu konformaciju koja prouzrokuje smanjenje graničnog napona između vodene i vazdušne faze. Nakon formiranja pene ona može biti uništena samo posredstvom tri glavne sile (gravitaciona drenaža, mehaničke smetnje i sile pritiska) [189,215]. Sposobnost stvaranja pene proteinskih molekula zavisi od više faktora, kao što su koncentracija proteina, pH, jonska jačina, sastav vodene faze, temperatura i metoda koja se koristi kako bi došlo do formiranja pene. Hemijske i fizičke modifikacije proteina mogu uticati na povećanje sposobnosti stvaranja pene [216].

Proteini belanceta spadaju u globularne proteine koje sadrže slobodne sulfhidrilne grupe i disulfidne veze. Međusobna interakcija proteina prisutnih u belancetu je omogućena zahvaljujući hidrofobnim interakcijama i međumolekulskim sulfhidril-disulfidnim reakcijama izmene koje se javljaju tokom denaturacije proteina [18]. Glavni proteini belanceta koji određuju svojstva penjenja su globulini, lizozim, ovomukoid i ovomucin [217]. Globulini se smatraju proteinima koji su najviše površinski aktivni i istovremeno najzaslužniji za dobra svojstva penjenja proteina belanceta [218]. Razlog njihovog velikog

uticaja na svojstva penjenja jeste njihova velika viskoznost zahvaljući kojoj se sprečava drenaža tečne faze iz mehurića vazduha prilikom formiranja pene. Pozitivno naelektrisan lizozim, takođe, znatno doprinosi formiranju i stabilnosti pene proteina belanceta. Tokom nastanka pene, pozitivno naelektrisan lizozim, zajedno sa negativno naelektrisanim ostalim proteinima belanceta (u najvećoj meri ovomucin) migrira ka međufaznoj površini vazduha gde dolazi do njihove međusobne interakcije, koja utiče na smanjuje elektrostatičkih odbojnih sila i stabilizaciju pene [19]. Ovomukoid je zaslužan za usporavanje drenaže tečne faze zbog svoje velike viskoznosti, dok je za ovomucin karakteristično to da se lako denaturišu, pa time utiče na formiranje stabilnog filma oko vazdušnih mehurića unutar pene [218-220].

Pregledom literature utvrđeno je da tretiranjem belanceta UV zračenjem dolazi do povećanja sposobnosti penjenja, kao i do povećanja njene stabilnosti. UV zračenje utiče na promenu sekundarne strukture proteina belanceta zbog tendencije proteina da zauzmu bolji položaj nakon umrežavanja koje je indukovano UV zračenjem. Ali i sar. (2011) su došli do zaključka da polimerizacija i umrežavanje proteina može poboljšati sposobnost proteina da formiraju penu zbog povećanog međupovršinskog umrežavanja tokom njenog formiranja, ali i zbog toga što su umrežene strukture otpornije na oštre uslove denaturacije u odnosu na nativan protein, pri visokim brzinama homogenizacije koje su neophodne za formiranje emulzija i pene [221].

Za razliku od primene UV zračenja kao pretretmana, druga grupa autora se bavila uticajem termičkog pretretmana na sposobnost formiranja pene. Istraživanja su urađena na dve različite pH vrednosti i to na pH 7,6 koje odgovara svežem jajetu i pH 8,8 koji je zabeležen kod nešto starijeg jajeta. Zaključci do kojih su došli su ti da povećanje temperature utiče na smanjenje sposobnosti penjenja belanceta na pH 7,6, a povećanje na pH 8,8 u odnosu na netretirane uzorke. Za obe pH vrednosti potvrđena je stabilnost pene na temperaturama iznad 55 °C, što je posledica povećanja proteinskih interakcija i to najverovatnije između termički izloženih hidrofobnih ili sulfhidrilnih grupa [222]. Rodriguez Patino i sar. (1995) su ispitali uticaj temperature (5 - 40 °C) tečnog belanceta na stabilnost pene i utvrdili su da se stabilnija pena dobija na nižim temperaturama (5 - 20 °C) [223]. Takođe, utvrđeno je da je uticaj temperature u bliskoj vezi sa koncentracijom proteina belanceta, pri čemu je zabeleženo da povećanje temperature i koncentracije

proteina negativno utiče na stabilnost pene belanceta, zbog stvaranja većih mehurića vazduha [224,225]. Prema istraživanjima Vega i sar. (2012) može se reći da su svojstva penjenja belanceta unapređena variranjem temperature u opsegu od 21 do 27 °C, dok na 2 °C nije postignuto značajno unapređenje penjenja [226]. Istraživanja Houpa (Hope) i sar. (2010) bavila su se uticajem visokog pritiska (400 - 800 MPa, 5 min, 4°C) na svojstva penjenja proteina belanceta i ustanovljeno je da povećanje pritiska dovodi do povećanja svojstava formiranja pene [30]. Takođe, utvrđeno je da pH belanceta znatno doprinosi formiranju pene, pri čemu su najbolji rezultati postignuti na pH 4,5. Kako je izoelektrična tačka ovalbumina i ovomucina na 4,5 i 4,1, redom, može se zaključiti da je na pH 4,5 došlo do smanjenja elektrostatičkih odbojnih sila među molekulima proteina, čime je omogućeno njihovo lakše adsorbovanje na međufaznu površinu vazduh - voda izazvano odmotavanjem molekula pri ovoj pH vrednosti. Nasuprot ovim rezultatima, studije Vander Plankena (Van der Plancken) i sar. (2007) tvrde da visok pritisak značajno utiče na smanjenje stabilnosti pene proteina belanceta [222].

Poznato je da su idealni proteini za formiranje i stabilizaciju pene oni koji imaju malu molekulsku masu, veliku površinsku hidrofobnost, dobru rastvorljivost, lako se denaturišu i imaju malo neto naeletrisanje u odnosu na pH samih prehrambenih proizvoda. Gore navedeni primeri su dokaz da proteini belanceta imaju ova svojstva, ali mogućnost dobijanja proteina sa još boljim karakteristikama se može postići adekvatnom enzimskom hidrolizom. Enzimaska hidroliza utiče na smanjenje molekulske mase, povećava rastvorljivost, hidrofobnost i fleksibilnost proteina i zbog toga se olakšava formiranje pene. Hameršoj (Hammershoj) i sar. (2008) su utvrdili povećanje sposobnosti penjenja ovomucina nakon njegove enzimske hidrolize [59]. Čenčen (Chen Chen) i sar. (2012) su ispitivali sposobnost penjenja dobijenih hidrolizata belanceta na različitim pH vrednostima i pri različitim stepenima hidrolize. Uloga proteaze pripala je tripsinu, a dobijeni su sledeći rezultati: najveći kapacitet penjenja je postignut pri pH vrednosti između 3 i 5, a najmanji pri pH 7, da bi nagli skok bio zapažen pri pH 8, a zatim pad pri pH 9. Isti trend je dobijen i za stabilnost pene [11]. Istraživanja Čo (Cho) i sar. (2014) su, takođe, pokazala da su svojstva penjenja hidrolizata proteina belanceta uslovljena pH vrednošću, pri čemu je na pH 3,6 kapacitet formiranja pene bio najveći, a primećen je pad u alkalnoj sredini, na pH

7,6 i 9. Ispitan je i uticaj vrste proteaze na svojstva penjenja hidrolizata proteina belanceta i najbolji rezultati su ostvareni kada je hidroliza bila izvedena dejstvom neutraze [227].

4.2.2. Emulgaciona svojstva

Emulgaciona svojstva proteina zavise od dva efekta: (1) značajnog smanjena površinskog napona usled adsorpcije proteina na površini ulje - voda i (2) elektrostatičke, strukturne i mehaničke energetske barijere prouzrokovane međugraničnim slojem koji se suprostavlja destabilizaciji procesa stvaranja emulzije [228]. Aktivnost stvaranja proteinskih emulzija predstavlja sposobnost proteina da učestvuju u procesu stvaranja emulzije i da stabilišu novonastalu emulziju, dok emulgujući kapacitet predstavlja sposobnost proteinskog rastvora ili suspenzije da emulguje ulje. U nekim namirnicama, prirodni proteini deluju kao efektivni stabilizatori. Proteini su efikasni površinsko-aktivni agensi, jer poseduju sposobnost snižavanja međupovršinskog napona između hidrofobnih i hidrofilnih komponenti hrane. Oni učestvuju u formiranju „ulje u vodi“ i „voda u ulju“ emulzija i utiču na stabilnost ovih emulzija koja je posledica formiranja zaštitne barijere oko kapljica masti koje sprečavaju stapanje emulzija. Emulgujući kapacitet proteina zavisi od oblika, naelektrisanja i hidrofobnosti proteinskih molekula, kao i od neutralisanja dipola i hidratacije polarnih grupa, dok je za stabilnost emulzija odgovorna jačina ovih interakcija. Da bi mogli da učestvuju u stvaranju stabilnih emulzija, proteinski molekuli moraju biti, pre svega, rastvorljivi, zatim, moraju imati sposobnosti brze adsorpcije na graničnoj površini i formiranja jakog kohezivnog filma, kao i dobro raspoređene naelektrisane grupe. Proteini mleka, na primer, stvaraju stabilne emulzije, jer komponente micelnog kazeina i proteina surutke poseduju sve gore navedene osobine [3,11,59].

Baveći se hidrolizom proteina belanceta i ispitivanjem funkcionalnih svojstava dobijenih hidrolizata, jedna grupa autora se posvetila upravo emulgacionim svojstvima hidrolizata dobijenih dejstvom tripsina. Rezultati emulgacione sposobnosti su dati u vidu indeksa aktivnosti emulzije (*IAE*) i indeksa stabilnosti emulzije (*ISE*), a sam proces je praćen pri različitim stepenima hidrolize (*SH*) i pH vrednostima. Pokazano je smanjenje oba indeksa sa povećanjem stepena hidrolize, ali su ove vrednosti veće u odnosu na nehidrolizovane proteine belanceta [11]. Ovi rezultati su u saglasnosti sa onima koji su dobili drugi autori [229]. Uzimajući u obzir uticaj pH vrednosti na *IAE* i *ISE*, pri pH 5 su dobijene najmanje vrednosti, a najveći skok je zabeležen pri pH 9, što je u saglasnosti i sa

rezultatima rastvorljivosti ovih hidrolizata. pH ima značajan efekat na aktivnost emulzija zbog toga što emulgaciona aktivnost rastvorljivih proteina zavisi od hidrofilno - lipofilne ravnoteže koja je zavisna od pH vrednosti. Na graničnoj površini ulje - voda dolazi do orijentacije lipofilnih delova molekula proteina ka uljanoj fazi, dok su hidrofilni delovi orijentisani ka vodenoj fazi, pa se snižava površinski napon na graničnom sloju. Iz rezultata se može zaključiti da pri većim pH vrednostima proteini/peptidi se više „odmotavaju“ i hidrofobni regioni postaju više dostupni, pa je usled toga olakšana bolja orijentacija ka graničnom sloju.

Druga grupa autora se bavila hidrolizom proteina belanceta papainom i ispitivala uticaj pH i koncentracije hidrolizata na emulgaciona svojstva. Što se tiče uticaja koncentracije na emulgaciona svojstva, sa povećanjem koncentracije hidrolizata dolazi do smanjenja indeksa aktivnosti emulzije. Smanjenje sposobnosti emulgovanja sa povećanjem koncentracije se može objasniti brzinom adsorpcije, jer pri malim koncentracijama proteina njihova adsorpcija je difuziono kontrolisana, dok je pri većim koncentracijama potrebno savladati veću energetska barijeru kako bi došlo do migracije molekula i njihove difuzije, pa zbog toga dolazi do nagomilavanja molekula proteina u vodenoj fazi. Sa druge strane, smanjenje stabilnosti emulzije sa povećanjem koncentracije proteina je posledica većeg broja proteinskih interakcija koje dovode do smanjenja broja molekula na graničnoj površini, pa se pretpostavlja da tanji film utiče na stabilizaciju uljanih kapljica [1]. Ista grupa autora bavila se ispitivanjem načina sušenja hidrolizata proteina belanceta dobijenih dejstvom papaina i utvrdila da liofilizacija ne utiče na emulgaciona svojstva, dok sprej sušenje ima negativan uticaj [230]. Kuan i sar. (2011) su ispitivali uticaj UV zračenja (30, 60, 90 i 120 min) na emulgujuća svojstva proteina belanceta i utvrdili su da sa povećanjem vremena pretretmana dolazi do poboljšanja emulgacionih svojstava, pri čemu su formirane emulzije pokazale stabilnost u vremenskom intervalu od 20 min [216]. Druga grupa autora bavila se ispitivanjem uticaja pH na indeks aktivnosti emulzija hidrolizata proteina belanceta dobijenih pomoću neutraze i utvrdila je da dolazi do smanjenja IAE na nižim pH vrednostima. Zabeleženo je značajno unapređenje indeksa aktivnosti emulzije u odnosu na nehidrolizovano belance i to posebno na pH 7,6 [227].

4.2.3. Rastvorljivost

Rastvorljivost proteina je jedna od najvažnijih karakteristika molekula koja izuzetno utiče na druga funkcionalna svojstva. Na osnovu rastvorljivosti, može se pretpostaviti stepen denaturacije i/ili agregacije proteina, a mogu se predvideti i međusobne interakcije proteinskih molekula, kao i interakcije proteina sa molekulima rastvarača koje određuju funkcionalna svojstva proteina.

Rastvorljivost proteina je povezana sa promenom ukupne slobodne energije hidrofobnih i hidrofilnih površinskih proteinskih interakcija sa molekulima rastvarača. Ekstremno visoke temperature dovode do narušavanja tercijarne strukture globularnih proteina koje je praćeno ireverzibilnim gubitkom rastvorljivosti, što za posledicu ima precipitaciju ili koagulaciju proteina. Evidentno je da nerastvorljivi proteini nisu od značaja za primenu u prehrambenoj industiji, stoga je neophodno kontrolisati uslove sredine, kao i eventualnu primenu neke od tehnika denaturacije proteina sa ciljem poboljšanja njihove rastvorljivosti. Potrebno je istaći da smanjena rastvorljivost proteina ne utiče na svojstva penjenja i emulgujuća svojstva, jer su ona karakteristika površinske aktivnosti proteina [231].

Rastvorljivost predstavlja termodinamički parametar definisan kao ona koncentracija proteina zasićenog rastvora koja je u ravnoteži sa čvrstom fazom (kristalna ili amorfna) pod tačno definisanim uslovima [232]. Može biti uslovljena spoljašnjim i unutrašnjim faktorima. Spoljašnji faktori koji utiču na rastvorljivost proteina uključuju pH rastvora, jonsku jačinu, temperaturu i prisustvo određenih supstanci u rastvoru [233]. Variranjem spoljašnjih faktora može se uticati na povećanje rastvorljivosti proteina [234,235]. Međutim, promena uslova sredine nije uvek dovoljna da bi se rastvorljivost proteina povećala u željenoj meri. Unutrašnji faktori koji utiču na stepen rastvorljivosti proteina su, pre svega, definisani aminokiselinskim sastavom proteina na njegovoj površini, ali informacija o tome kako je moguće uticati na izmenu unutrašnjih faktora u cilju povećanja rastvorljivosti je veoma malo [236].

Delimično ili u retkim slučajevima potpuno denaturisani proteini sa izrazito hidrofobnim karakterom su daleko manje rastvorljivi u poređenju sa nativnim proteinima. U većini slučajeva, denaturacija proteina prouzrokuje замуćenost rastvora proteina (povećan turbiditet) koja se karakteriše pojavom sitnih čestica proteina [237-239]. Stoga je neophodno napraviti razliku između smanjenja rastvorljivosti prouzrokovane denaturacijom

proteina i/ili koloidnom nestabilnošću rastvora proteina. U zavisnosti od toga da li je smanjena rastvorljivost proteina biohemijske ili fizičkohemijske prirode, teži se njenom unapređenu različitim tehnikama. Sa biohemijskog stanovišta, rastvorljivost proteina zavisi od aminokiselinskog sastava proteina i prisustva specifičnih aminokiselina na međugraničnoj površini protein-rastvarač (voda najčešće). Ako se uzmu u obzir koloidna i fizičkohemijska svojstva, može se reći da je rastvorljivost proteina u ovom slučaju uslovljena osobinama rastvarača, temperaturom, polarnošću rastvarača, kao i prisustvom ekscipijenata (razne supstance) [240]. Fizičke sile odgovorne za rastvorljivost proteina su elektrostatičke interakcije, jonske veze, vodonične veze, stepen protonizacije, disperzione sile, osmotski pritisak, hidrofobne interakcije, solvatacija i hidratacija, kao i protein-rastvarač, protein-ekscipijent i/ili protein-protein međusobne interakcije [241,242]. Prisustvo nekih drugih supstanci ili primesa ogleđa se u direktnom ili indirektnom kontaktu sa molekulima proteina u različitim stanjima (nativno, denaturisano, delimično denaturisano). Na primer, aminokiselina arginin se često koristi kako bi se povećala rastvorljivost proteina, naročito u procesima prečišćavanja [243].

Konkretno vezano za proteine belanceta, Gomes i sar. (2012) su objavili da je rastvorljivost proteina belanceta uslovljena promenom pH i temperature. Variran je temperaturni opseg u intervalu od 40 - 100 °C i pH od 7,5 do 9. Najmanja rastvorljivost je zabeležena na 60 °C, što je objašnjeno koagulacijom proteina na ovoj temperaturi [244]. U studijama koje su se bazirale na ispitivanju uticaja pH i koncentracije rastvora NaCl na rastvorljivost proteina belanceta, pokazano je da su najrastvorljiviji proteini dobijeni na pH 9 za sve testirane koncentracije rastvora NaCl. Minimalna rastvorljivost je zabeležena na pH 4,6 [245]. Enzimska hidroliza proteina belanceta tripsinom se pokazala efikasnim izborom za poboljšanje rastvorljivosti proteina belanceta, pri čemu je zabeležena zavisnost rastvorljivosti od stepena hidrolize. Povećanje stepena hidrolize uticalo je na povećanje rastvorljivosti hidrolizata proteina belanceta [11]. Očigledno je da je enzimska hidroliza uticala na smanjenje molekulske mase i hidrofobnost proteina, kao i na povećan sadržaj polarnih i jonizujućih grupa. Povećanje stepena hidrolize uticalo je pojavu manjih peptida belanceta sa prisustvom većeg broja polarnih aminokiselinskih ostataka u odnosu na nehidrolizovane proteine. Studije Čena (Chen) i sar. (2012) su se bavile hidrolizom proteina belanceta papainom i ispitivanjem uticaja pH vrednosti i koncentracije hidrolizata (od 0,1

do 1%) na rastvorljivost dobijenih hidrolizata. Rezultati rastvorljivosti su pokazali za 93% veću rastvorljivost hidrolizata i to za sve tri koncentracije u odnosu na nehidrolizovani uzorak. Velika rastvorljivost je objašnjena smanjenjem veličine proteinskih molekula formiranjem manjih, hidrofilnijih i rastvorljivijih proteinskih jedinica [1]. Što se tiče uticaja tretmana visokim pritiskom na povećanje rastvorljivosti proteina belanceta, studije Leija (Lai) i sar. (2010) su pokazale da tretman visokim pritiskom u intervalu od 300 - 500 MPa dovodi do smanjenja rastvorljivosti proteina za 3,7% [246]. U poređenju sa ovim rezultatima, istraživanja Vander Plankena i sar. (2005) pokazala su smanjenje rastvorljivosti proteina belanceta (10% (v/v) rastvor u Tris-HCl puferu, pH 7,6) za 10% pri tretmanu od 100 - 500 MPa i na 25 °C, a pri tretmanu od 550 - 700 MPa rastvorljivost je smanjenja sa 60 na 40% [247,248].

4.2.4. Svarljivost proteina (digestibilnost)

Digestija proteina *in vivo* podrazumeva lučenje nekoliko specifičnih enzima (digestivni enzimi). Prilikom konzumacije proteina, dolazi do lučenja hlorovodonične kiseline u stomaku, koja je praćena oslobađanjem glavnog enzima odgovornog za varenje proteina, a to je pepsin. Pepsin je karakterističan po tome što dovodi do hidrolize peptidnih veza između hidrofobnih aminokiselinskih ostataka, kao što su ostaci fenilalanina, tirozina, triptofana i leucina i najaktivniji je na pH vrednostima ispod 2. Hormoni utiču na izlučivanje natrijum-bikarbonata u tanko crevo, prilikom čega dolazi do povećanja pH vrednosti na 8. Pri ovim uslovima dolazi do oslobađanja tripsina (aktivan na pH 8) koji napada peptidne veze karboksilnog kraja u čiji sastav ulaze aminokiseline lizin i arginin (osim kada se iza lizina i arginina nalazi prolin). Tripsin podstiče oslobađanje još jednog enzima bitnog za varenje proteina, himotripsina, koji hidrolizuje peptidne veze na karboksilnom kraju tirozina, triptofana i fenilalanina. Tripsin i himotripsin imaju veću specifičnost ka hidrolizi peptidnih veza u odnosu na pepsin [249].

In vitro enzimski digestija proteina belanceta je ispitana u nekoliko slučajeva. Istraživanja Minea (Mine) i sar. (2004) su se bavila enzimskom digestijom lizozima iz belanceta, pri čemu su hidrolizati lizozima bili podvrgnuti prvo digestiji sa pepsinom, a zatim i sa tripsinom [10]. Ova kombinacija enzima je korišćena zbog toga što je lizozim uglavnom otporan na dejstvo tripsina, ali ne i na dejstvo pepsina. Ustanovljeno je da prva digestija sa pepsinom značajno unapredila naknadnu hidrolizu pomoću tripsina. Tehnikom

SDS-PAGE elektroforeze, utvrđeno je da ne postoji razlika između nativnog i termički denaturisanog lizozima dobijenog nakon digestije sa pepsinom i tripsinom. Druga grupa autora bavila se digestijom ovomukoida iz belanceta, pri čemu su detektovani veliki fragmenti ovomukoida nakon šestočasovne digestije pepsinom [24]. Za razliku od lizozima, ovomukoid je zadržao svoju rezistenciju ka tripsinu nakon digestije pepsinom pri enzim supstrat odnosu 1:20 i 1:200 i na pH 2.

In vitro digestija ovalbumina pri uslovima sličnim fiziološkim je ispitana od strane Martosa (Martos) i sar. (2010). Na pH vrednosti 2 (ili nižim), ovalbumin se pokazao veoma otpornim ka digestiji pepsinom pri enzim susprtat odnosu 1:20. Međutim, prisustvo žučnih soli je uticalo na povećanje svarljivosti ovalbumina. Najbolji rezultati digestije pepsinom su postignuti na pH 1,2 pri čemu je količina enzima bila tri puta veća u odnosu na količinu proteina. Studija je, takođe, pokazala da je pH (ne odnos enzima) najvažniji faktor za povećanje svarljivosti ovalbumina [250]. Što se tiče primene tretmana pre enzimske hidrolize proteina belanceta, pokazano je da pretretman visokim pritiskom utiče na poboljšanje hidrolize proteina belanceta izvedene dejstvom tripsina [67]. Uspešnost hidrolize je, takođe, potvrđena i kada se kao enzim koristio α -himotripsin [251]. Quiros (Quiros) i sar. (2007) su utvrdili da dodatak pepsina, tripsina i himotripsina pre tretiranja ovalbumina visokim pritiskom pozitivno utiče na enzimsku reakciju hidrolize i dovodi do olakšanog oslobađanja manjih peptida [252].

Zbog velike biološke raspoloživosti i visokog sadržaja esencijalnih aminokiselina, proteini belanceta se smatraju bitnim izvorom dijetalnih proteina. Biološka raspoloživost proteina belanceta se povećava prilikom termičkog tretiranja i iznosi čak 95% u poređenju sa sirovim jajetom u kome je zabeleženo 65% [253]. Proteini belanceta u formi gela, nastali nakon tretmana visokim pritiskom, smatraju se svarljivijim u odnosu na proteine prisutne u kuvanom jajetu (termički tretman). Takođe, dokazano je da visok pritisak ne uništava vitamine i aminokiseline prisutne u belancetu, čime se ne utiče na narušavanje njihove nutritivne vrednosti [254]. Međutim, kada se govori o uticaju različitih pretretmana proteina belanceta sa ciljem poboljšanja njihove vrednosti, potrebno je voditi računa da ne dolazi do uspostavljanja štetnih hemijskih reakcija tokom samog procesiranja. Na primer, poznato je da termički tretman proteina belanceta dovodi do stvaranja lizinalanina, aminokiseline čije je prisustvo u bubrezima pacova dokazano kao štetno [255]. Prisustvo

ovog jedinjenja nije detektovano nakon procesiranja belanceta visokim pritiskom, dok o uticaju ultrazvučnog pretrmana na ova svojstva ne postoji dovoljan broj radova u literaturi.

4.3. Površinske karakteristike molekula proteina

4.3.1. Hidrofobnost

Sile koje povezuju i drže na okupu nepolarne regione proteinskih molekula u vodenim sredinama nazivaju se hidrofobne interakcije. Jačina ovih interakcija ne zavisi samo od tendencija ka smanjenju entropijski nepoželjnog stanja između nepolarnih grupa proteina i molekula vode, nego i od sposobnosti formiranja nekovalentnih interakcija poznatih kao Van der Valsove sile [256].

Najčešće korišćena definicija hidrofobnosti proteina bazirana je na prosečnoj hidrofobnosti aminokiselina koje ulaze u sastav proteina, izraženoj kao slobodna energija prenosa date aminokiseline iz vode u etanol, koja je karakteristika različite rastvorljivosti aminokiselina u dva različita rastvarača. Međutim, ova tvrdnja ne daje informacije o površinskoj hidrofobnosti molekula proteina koja je daleko važnija za funkcionalnost proteina.

Stepen hidrofobnosti proteina smatra se bitnim faktorom za funkcionalna svojstva proteina. Međutim, merenje hidrofobnosti proteina je otežano, jer ne postoje standardne metode kvantifikacije, nego se uglavnom koriste sprektrofluorimetrijske metode bazirane na primeni nekog fluorescentnog jedinjenja. Obično su to neki mali molekuli koji izazivaju promene fluorescentnih svojstava kao posledica nekovalentnog vezivanja za proteine [257]. Fluorimetrijske metode daju informaciju o prisustvu hidrofobnih regiona unutar proteina, ali ne daju kvantitativne informacije o raspodeli unutar svakog pojedinačnog peptidnog lanca. Jedinjenja čiji kvantni prinos fluorescencije i emisiona talasna dužina zavise od polarnosti uslova sredina, najčešće se koriste kao standardi za procenu hidrofobne ili nepolarne prirode proteina [258]. Postoje tri glavne vrste hidrofobnih standarda, a to su; anjonski, katjonski i neutralni. Među njima, najčešće se koristi anjonsko jedinjenje iz grupe aromatičnih sulfonskih kiselina, pod nazivom 8-anilino-1-naftalensulfonska kiselina (ANS). ANS ima izrazito nizak kvantni prinos fluorescencije u vodi i utvrđeno je da dolazi

do snažnog povećanja prilikom njegovog vezivanja za membrane ili hidrofobne regione unutar proteina [259].

4.3.2. Sulfhidrilne grupe

Sulfhidrilne grupe (SH) i disulfidne veze (SS) imaju veoma važan uticaj na funkcionalna svojstva proteina, jer utiču na regulaciju samoumrežavanja i stabilnost proteina [260]. Njihovo prisustvo ima znatan uticaj na agregaciju i geliranje velikog broja proteina, što je i potvrđeno od strane istraživača u mnogim studijama [261-263]. Sulfhidrilne grupe (ulaze u sastav cisteinskih ostataka) se smatraju veoma reaktivnim, te se stoga njihovim direktnim izmenama može uticati na različite modifikacije proteina. Na primer, blokiranjem sulfhidrilnih grupa utiče se na sprečavanje umrežavanja proteina. U te svrhe korišćeni su S-metil-metantiosulfonat (MMTS), N-etilmaleimid (NEM) i jodacetamid [264-266].

Smatra se da disulfidni mostovi igraju ključnu ulogu prilikom određivanja stabilnosti proteina, kao i tokom procesa agregacije i geliranja mnogih proteina, uključujući ovalbumin, vicilin i α -laktalbumin. [262,267,268]. Formiranje agregata i geliranje je posledica zajedničkog dejstva hidrofobnih, elektrostatičkih i kovalentnih interakcija [269]. Tiolatni jon ovalbumina posredstvom reakcije S-acetilmerkaptosukcinil anhidrida (S-AMSA) sa primarnim aminima dovodi do formiranja tioacetil grupa koje se razlažu dajući reaktivne sulfhidrilne grupe dodatkom hidroksilamina [270]. Stepem modifikacije može se pratiti variranjem odnosa S-acetilmerkaptosukcinil anhidrida i lizina [262]. Pored vezivanja sulfhidrilnih grupa, dolazi do konjugacije dodatnih karboksilnih grupa koje dovodi do varijacija u naelektrisanju molekula utičući direktno na agregaciju, geliranje ili stabilnost proteina. Tiolacijom ovalbumina na ovaj način, dolazi do ograničenih promena sekundarne i tercijarne strukture na osnovu čega se može zaključiti da je nativna struktura ovalbumina u velikoj meri zadržana nakon primenjene modifikacije. Takođe, ovo je uticalo na smanjenje termičke stabilnosti ovalbumina, a primećena je filamentozna morfologija molekula. Interesantno je istaći da nije došlo do promena u stopi agregacije uvođenjem dodatne sulfhidrilne grupe u molekul ovalbumina. Zaključeno je da formiranje disulfidnih mostova nije glavna pogonska sila za agregaciju ovalbumina, što je kasnije i potvrđeno činjenicom da na sobnoj temperaturi, pri kojoj je značajan broj sulfhidrilnih grupa već izložen, ne dolazi do agregacije proteina putem disulfidnih mostova [262].

5. ENZIMSKA HIDROLIZA

Brz razvoj biotehnologije, poljoprivrede i prehrambene industrije doveo je do stvaranja velikog broja visokokvalitetnih proteinskih proizvoda koji mogu da se koriste u ljudskoj ishrani. Enzimskom hidrolizom, sporedni proizvodi, kao što su proteini surutke, kolagen, proteini soje (β -konglicinin i glicinin) i sporedni proizvodi u industriji ribe mogu biti iskorišćeni za dobijanje proizvoda sa poboljšanim funkcionalnim i nutritivnim karakteristikama. Takođe, enzimskom hidrolizom proteina hrane mogu se dobiti odgovarajući peptidi sa antihipertenzivnom i antioksidativnom aktivnošću koju mogu da se koriste kao suplementi funkcionalne hrane [271]. Svojstva proteina mogu biti poboljšana enzimskom hidrolizom, a samim tim se proširuje i njihova upotreba u prehrambenoj industriji. Na primer, smanjenje viskoznosti je od ključne važnosti za procese mešanja fluida. U poređenju sa prvobitnim proteinom, hidrolizati su svarljiviji zbog manje molekulske mase, poseduju smanjenu alergeničnost i povećanu biološku iskorišćenost [272].

5.1. Enzimska hidroliza proteina

Hidroliza proteina predstavlja raskidanje peptidne veze, pri čemu nastaju kraći ili duži peptidni lanci i/ili aminonokiseline. Ovim postupkom dolazi do denaturacije proteina, odnosno protein gubi svoju nativnu strukturu i razvija se iz kvaternarne strukture reverzibilno ili ireverzibilno. Enzimska hidroliza je proces koji se izvodi pri blagim reakcionim uslovima, lako se kontroliše i omogućava dobijanje proizvoda sa željenim svojstvima. Takođe, ona dovodi do promene veličine molekula i promene hidrofobnosti proteina, kao i do promene polarnosti i jonizujućih grupa proteinskih hidrolizata, što direktno utiče na funkcionalne osobine dobijenih hidrolizata [230].

Procesom hidrolize se ne utiče uvek na poboljšanje funkcionalnih karakteristika proteina. Jedna grupa autora je izvodila hidrolizu kazeina V8 proteazom iz *Staphylococcus aureus* koja pokazuje specifičnost prema glutaminskoj kiselini. Stepen hidrolize kazeina je bio 2 i 6,7%, a molekulska masa dobijenih peptida od 1 do 16 kDa. Ovako dobijeni hidrolizati su pokazali značajno poboljšanje rastvorljivosti na pH 4 (blizu izoelektrične tačke kazeina), dok je emulgujuća aktivnost hidrolizata bila manja u poređenju sa nativnim proteinom [273].

Rastvorljivost, penjenje, geliranje i emulgaciona svojstva hidrolizata proteina zavise od specifičnosti samog enzima i stepena hidrolize (SH). Međutim, upotreba enzima dovodi do povećanja troškova samog procesa, pa se pribegava korišćenju jeftinih sirovina i supstrata [274]. Adekvatan izbor enzima je veoma bitan kako bi se obezbedila maksimalna biološka aktivnost dobijenih hidrolizata [275]. Enzimske tehnologije se smatraju „zelenim tehnologijama”, a za razliku od organskih supstanci, enzimi poseduju sposobnost razlikovanja grupa u molekulu što ih čini regiospecifičnim, a imaju sposobnost razlikovanja i enantiomernih supstanci zbog čega su i stereospecifični. Od svih enzima, hidrolitički su najjeftiniji i ne zahtevaju kofaktore, a upotreba proteaza u prehrambenoj industriji je odavno dobro poznata [276].

Kako bi se enzimskom hidrolizom dobili hidrolizati proteina sa željenim karakteristikama, neophodno je dobro poznavati mehanizam enzimske hidrolize. Određene proteaze su strogo specifične ka samo određenim aminokiselinama koje učestvuju u formiranju peptidne veze, dok su druge proteaze manje specifične. Stoga, enzimske reakcije hidrolize katalizovane protazama definisane su sa tri uzastopne reakcije koje se dešavaju tokom samog procesa hidrolize, a to su [277]:

1. formiranje kompleksa između nativnog peptida i enzima, poznatog kao Mihaelisov kompleks;
2. hidroliza peptidne veze prilikom koje se oslabada jedan ili dva peptida i
3. nukleofilni napad na ostatak Mihaelisovog kompleksa u cilju oslobađanja drugih peptida i rekonstitucije slobodnog enzima.

Enzimskom hidrolizom peptidnih veza povećava se broj jonizujućih grupa (NH_3^+ i COO^-), koji je praćen povećanjem hidrofobnosti molekula i ukupnog naelektrisanja, a uporedo i smanjenjem molekulske mase peptida i strukturnim promenama unutar molekula proteina [278]. Nakon dodatka enzima u reakcionu smešu molekula proteina, dolazi do formiranja enzim-supstrat kompleksa koji može da disosuje i dovede do formiranja slobodnog enzima i supstrata ili slobodnog enzima i proizvoda reakcije [279]. Generalno prihvaćen mehanizam enzimske hidrolize proteina proteazama zasniva se na činjenici da je disocijacija Mihaelisovog kompleksa na slobodan enzim i proizvod reakcije, stupanj koji kontroliše ukupnu brzinu reakcije hidrolize.

Uopšteno govoreći, može se reći da enzimaska hidroliza proteina predstavlja složen proces zbog prisustva velikog broja peptidnih veza i njihove različite dostupnosti molekulima enzima [280]. Potrebno je istaći i da specifičnost enzima nije jedini faktor koji utiče na profil peptida dobijenih hidrolizata. Temperatura i pH reakcije su, takođe, jako bitni faktori koji moraju biti optimizovani prilikom izvođenja bilo koje enzimске reakcije hidrolize proteina. Temperatura i pH značajno utiču na brzinu odvijanja enzimске reakcije, a svaki enzim poseduje optimalnu temperaturu i pH vrednost pri kojoj je najaktivniji. Ekstremno visoka temperatura i pH dovode do denaturacije enzima utičući na taj način na njegovu dezaktivaciju.

Jedan od glavnih problema sa kojim se prehrambena industrija susreće pri pokušaju komercijalizacije proteinskih hidrolizata jeste gorak ukus većine hidrolizata (ili odsustvo ukusa) koji je posledica prisustva hidrofobnih aminokiselinskih sekvenci u proteinima male molekulske mase (Tabela 5.1) [281]. Aminokiseline koje utiču na formiranje gorčine proteinskih hidrolizata su: valin, izoleucin, fenilalanin, triptofan, leucin i tirozin [282]. Isto tako, prisustvo prolina lociranog u unutrašnjosti proteinskih lanaca smatra se odgovornim za gorak ukus hidrolizata usled jedinstvene konformacije slične imino kiselinama (ne poseduje primarnu amino grupu) [283]. Veliki broj gorkih peptida je izolovan nakon enzimске hidrolize kazeina, hemoglobina, proteina soje, zeina (protein kukuruza) i proteina ribe [284-288]. Mnoge mere su preduzete kako bi se eliminisao ovaj faktor, uključujući adsorpciju supstanci koje izazivaju gorčinu na aktivni ugaj, talk i β -ciklodekstrin, kao i ultrafiltraciju tokom procesa hidrolize u membranskom reaktoru. Između ostalog, upotreba egzopeptidaza se pokazala kao veoma efikasna [289]. Egzopeptidaza iz *Aspergillus oryzae* se pokazala kao korisna za smanjenje gorčine hidrolizata kazeina, proteina surutke i glutena, a takođe i aminopeptidaze iz *Streptococcus lactis* i *Thermus aquaticus* YT-1. Pšenična karboksipeptidaza utiče na smanjene gorčine hidrolizata kazeina oslobađanjem aminokiselina sa C-terminalnog kraja peptida. Generalno, tretmani sa egzopeptidazama su se pokazali kao praktični pristupi za regulisanje gorčine proteinskih hidrolizata [290]. Pojedini autori su ustanovili da peptidaza iz *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11, takođe, utiče na smanjenje gorčine pet peptida izolovanih iz čedar sira, dok su drugi istraživači utvrdili da dolazi do smanjenja gorčine frakcije peptida izolovane iz obranog mleka korišćenjem *Aspergillus* proteaze P194 [291,292].

Tabela 5.1. Problemi koji se javljaju prilikom enzimске hidrolize proteina [293]

Problem	Uzrok	Poboljšanje
Gorčina hidrolizata	Reakcija hidrolize nije optimizovana sa aspekta stepena hidrolize i/ili izbora enzima	Izabrati odgovarajući enzim i podesiti stepen hidrolize da ne bude ni suviše mali ni suviše veliki
	Previše jak termički tretman	Zameniti termičke tretmane netermičkim postupcima
	Suviše dugo zadržavanje na visokoj temperaturi	Smanjiti dugo tretiranje visokom temperaturom naročito ako je proizvod koncentrovan
Hidrolizati nemaju ukus	Infekcija u toku obrade	Proveriti kvalitet supstrata i/ili smanjiti vreme procesa u kome je moguć rast mikroba. Druga mogućnost je pasterizacija ili dodatak soli.
Spora hidroliza	Temperatura izvan kontrole	Proveriti temperaturu upotrebom drugog termometra
	Mala količina enzima	Povećati količinu enzima
	Gubitak aktivnosti enzima usled neadekvatnog čuvanja	Proveriti način čuvanja i rok trajanja enzima
	Razblaženje enzima vodom pre upotrebe	Enzim je stabilan samo u originalnoj formulaciji, stoga ga ne treba razblaživati
	Inhibitor proteaza u supstratu	Eliminisati inhibitore termičkom denaturacijom ili nekim drugim fizičkim pretretmanom
	Koncentracija proteina drugačija od očekivane	Proveriti koncentraciju i ako je potrebno podesiti je dodatkom rastvora NaOH ili NaCl
	pH izvan opsega	Proveriti pH i podesiti na odovarajući

5.2. Stepen hidrolize (SH)

Stepen hidrolize predstavlja glavni parametar koji određuje veličinu i sekvencu peptida nastalih tokom enzimske hidrolize nativnih proteina i zavisi od broja raskinutih peptidnih veza supstrata [277]. Uopšteno, stepen hidrolize se može definisati kao odnos raskinutih peptidnih veza supstrata i ukupnih peptidnih veza prisutnih u molekulu nativnog proteina i može se izračunati korišćenjem sledeće formule:

$$SH (\%) = (h / h_{tot}) \times 100 \quad (5.1)$$

gde h predstavlja broj hidrolizovanih peptidnih veza, a h_{tot} je ukupan broj peptidnih veza supstrata. Standardna metoda za određivanje stepena hidrolize ne postoji, nego se uglavnom koriste različite metode, a neke od najčešće korišćenih u literaturi su: pH-stat metoda, osmometrijska metoda, određivanje slobodnog azota nakon precipitacije trihlorsirćetnom kiselinom (*na engl.* TCA method), formol titracija, OPA metoda (o-ftalaldehid) i TNBS metoda (2,4,6-trinitrobenzensulfonska kiselina) [294].

Prednosti i nedostaci najčešće korišćenih metoda za određivanje stepena hidrolize proteina dati su u Tabeli 5.2.

Glavni faktori koji utiču na stepen hidrolize proteina jesu:

1. odnos enzima i supstrata,
2. temperatura na kojoj se odigrava reakcije hidrolize,
3. pH reakcije i
4. vreme trajanja reakcije hidrolize.

Odnos enzima i supstrata

Kako je početna brzina reakcije hidrolize proporcionalna koncentraciji enzima, povećanje brzine reakcije se može postići povećanjem koncentracije enzima, pri čemu povećanje stepena hidrolize u tačno definisanom vremenskom intervalu prati trend krive hiperbole. Povećanje količine proteaze utiče na raskidanje većeg broja peptidnih veza supstrata što pozitivno utiče na sam tok reakcije hidrolize, a praćeno je i naknadnim povećanjem rastvorljivosti proteina [295]. Generalno, sa odgovarajućom količinom proteaze, stepen hidrolize je proporcionalan količini enzima. Potrebno je naglasiti da prevelika koncentracija enzima negativno utiče na tok reakcije hidrolize, dovodeći do smanjenja stepena hidrolize. U početku reakcije, sa povećanjem količine enzima dolazi do naglog povećanja brzine reakcije, sve do momenta kada svi molekuli supstrata budu zasićeni enzimom i tada dolazi do smanjenja brzine reakcije hidrolize [296]. Šahidi

(Shahidi) i sar. (1995) su utvrdili znatno povećanje stepena hidrolize tokom početne faze reakcije hidrolize i nisu zabeležili povećanje stepena hidrolize prilikom dodatka nove količine enzima u stacionarnoj fazi reakcije [297]. Takođe, jedan od mogućih razloga smanjenja brzine reakcije hidrolize jeste inhibicija enzima peptidima nastalim tokom hidrolize [298]. Nije primećen porast stepena hidrolize tokom hidrolize proteina iz *Mallotus villosus* (na engl. capelin mince) nakon dodatka nove količine enzima u reakcionu smešu. Moguća inhibicija reakcije hidrolize može biti posledica prisustva proizvoda reakcije (nastali peptidi) ili hidrolize svih dostupnih peptidnih veza supstrata. Kako je prevelika koncentracija rastvorljivih peptida nepovoljna sa aspekta brzine enzimske reakcije hidrolize, poželjno je ukloniti nastale peptide iz reakcione smeše kako bi došlo do povećanja brzine reakcije [297]. Studije su pokazale da povećanje koncentracije enzima dovodi to povećanja brzine reakcije hidrolize proteina iz tkiva ribe, navodeći da je jako teško objasniti ovaj fenomen zbog kompleksnosti samog supstrata koji je karakterističan po prisustvu velikog broja inhibitora proteaza. Isto tako, Kristinson (Kristinsson) i sar. (2000) su tvrdili da je kinetika hidrolize proteina ribe komplikovan proces zbog velikog broja različitih peptidnih veza i njihove specifičnosti ka enzimu tokom reakcije hidrolize [277].

Temperatura reakcije

Povećanje temperature reakcije dovodi do povećanja brzine reakcije hidrolize, jer se učestalost sudara molekula enzima i supstrata povećava i dolazi do smanjenja energije aktivacije. Smanjenjem energije aktivacije veliki broj molekula može efikasno reagovati dajući proizvode reakcije (peptide). Ipak, preterano povećanje temperature negativno utiče na brzinu reakcije hidrolize, dovodeći do denaturacije enzima. Postoji optimalna temperatura na kojoj je aktivnost enzima maksimalna, a iznad koje aktivnost enzima naglo opada. Za proteine koji su veoma osetljivi na termičku denaturaciju, početno povećanje temperature reakcije dovodi do tzv. odmotavanja molekula proteina i izlaganja peptidnih veza iz unutrašnjosti molekula proteina molekulima enzima. Dalje povećanje temperature utiče na uspostavljanje hidrofobnih interakcija koje dovode do agregacije molekula proteina utičući tako na sprečavanje dalje hidrolize dostupnih peptidnih veza. Dva glavna uticaja temperature na brzinu reakcije hidrolize jesu povećanje brzine hidrolize i povećanje stope denaturacije enzima [296].

Kako bi uopšte došlo do hidrolize proteina, moraju se postići efikasni sudari između enzima i proteina koji bi doveli do vezivanja proteina za aktivno mesto enzima. Sa povećanjem temperature povećava se učestalost sudara u jedinici vremena, pa se i brzina reakcije povećava u okviru dozvoljenih granica. Isto tako, povećanje temperature reakcije dovodi do povećanja unutrašnje energije molekula koja uključuje translatorsku energiju, energiju rotacije i vibracije molekula, kao i energiju hemijskih veza i energiju međumolekulskih interakcija. Ako je unutrašnja energija proteina prilično velika, može doći do raskidanja veza koje učestvuju u održavanju trodimenzionalne strukture proteina, a samim tim i do termičke denaturacije proteina. Stoga, previše visoka temperatura može uticati na smanjenje brzine reakcije hidrolize koje može biti objašnjeno denaturacijom i/ili dezaktivacijom enzima ili supstrata [200].

pH reakcije

Uticaj pH vrednosti na kojoj se odigrava enzimska reakcija hidrolize proteina je ključan faktor i zavisi od prirode enzima i supstrata. Promena pH utiče na raspodelu naelektrisanja i konformaciju molekula enzima i supstrata, a takođe je bitna kako ne bi došlo do ireverzibilne denaturacije enzima u ekstremno kiselim i alkalnim sredinama koja je praćena gubitkom njihove aktivnosti [299,300]. Isto tako, pH utiče na jonizaciju grupa koje učestvuju u održavanju odgovarajuće konformacije aktivnog centra enzima, vezivanje supstrata za enzim i konverziju supstrata u proizvod [300]. Ove grupe su locirane u unutrašnjosti kiselih i baznih aminokiselinskih ostataka.

Ekstremne pH vrednosti imaju štetan uticaj na proteine i peptide. Poznato je da se mnogi proteini odmotavaju na pH vrednostima manjim od 5 ili većim od 10, što je uglavnom posledica toga što uvijeni proteini (ili oligopeptidi) poseduju sakrivene grupe (nejonizovane) unutar svoje strukture koje mogu biti jonizovane jedino nakon odmotavanja proteina [301]. Takođe, ekstremno velike pH vrednosti mogu dovesti do raskidanja jonskih mostova između jonizujućih grupa. Iz svega navedenog, zaključuje se da je optimalna pH vrednost karakteristika svakog enzima i neophodno je izvođene enzimске reakcije upravo na odgovarajućoj pH vrednosti za dati enzim.

Vreme trajanja reakcije hidrolize

Kriva hidrolize u funkciji vremena je obično definisana sa dve faze, početnom brzom fazom i sporom, opadajućom fazom, kada je količina supstrata u sistemu smanjena. Tokom prve faze dolazi do hidrolize polipeptidnih lanaca, dok je druga faza karakteristična po hidrolizi manjih peptida. Sa vremenom se brzina reakcije smanjuje što može biti posledica smanjenja aktivnosti enzima, zasićenja enzima supstratom ili inhibicije enzima proizvodom reakcije [297]. Takođe, smanjenje brzine reakcije tokom vremena objašnjava se dezaktivacijom enzima ili inhibicijom enzima [302]. Postoje dva uopštena mehanizma hidrolize proteina, od kojih je prvi poznat po tome da dovodi do sekvencionalnog oslobađanja jednog peptida u određenom vremenskom intervalu (*na engl. one by one mechanism*), dok je za drugi karakteristično formiranje intermedijara koji se naknadno hidrolizuje (*na engl. zipper mechanism*) [302,303]. Vreme trajanja reakcije hidrolize je bitno i sa aspekta isplativosti procesa prilikom njegove implementacije u prehrambenoj industriji. Povećanje vremena hidrolize u cilju neznatnog povećanja stepena hidrolize nije ekonomski opravdano, jer utiče na povećanje kapitalnih i operativnih troškova proizvodnje. Stoga se preporučuje da se procesi bazirani na hidrolizi proteina iz različitih izvora vode u reaktorima manjih zapremina i budu vremenski kraći, jer se na taj način smanjuju ukupni troškovi proizvodnje i omogućava isplativa proizvodnja.

Tabela 5.2. Najčešće korišćene metode za određivanje stepena hidrolize proteina

Metoda	Prednost	Nedostatak
<i>pH-stat</i>	Praćenje u realnom vremenu Ne utiče na denaturaciju proteina Brza metoda Nema derivatizaciju	Preciznost zavisi od vrste enzima Egzoproteaze daju lošu procenu SH Odnos potrošnje baze i SH nije precizan za sve proteine Samo za alkalne reakcione smeše
<i>TNBS</i>	Generalno tačna i precizna Brza derivatizacija	Nemogućnost praćenja u realnom vremenu Samo za rastvorljive uzorke Toksično jedinjenje Interferira sa ostacima lizina Zahteva korak derivatizacije Netačna za proteine bogate prolinom
<i>OPA</i>	Brza derivatizacija Praćenje u realnom vremenu	Neprecizna za proteine bogate cisteinom i/ili prolinom Samo za rastvorljive uzorke Interferira sa ostacima lizina Zahteva korak derivatizacije
<i>TCA</i>	Brza metoda	Određuje rastvoreni azot, pre nego stepen hidrolize
<i>Formol titracija</i>	Brza metoda Praćenje u realnom vremenu	Indirektna i direktna metoda ne daju različite rezultate Promenljivi rezultati

5.3. Proteaze

Proteolitički enzimi ili proteaze predstavljaju veliku grupu enzima koji katalizuju hidrolizu peptidne veze u molekulima proteina i peptida pri čemu ih razlažu na proizvode manje molekulske mase. Reakcija hidrolize je reverzibilna, pa proteaze mogu pod određenim uslovima da katalizuju i povrtanu reakciju sinteze peptida uz izdvajanje vode. Prema Međunarodnoj nomenklaturi proteaze spadaju u treću grupu enzima - hidrolaze, podgrupu 3.4. - peptid - hidrolaze.

Kako su proteini veoma rasprostranjeni u prirodi, ovi enzimi imaju najveći industrijski značaj. Njihova godišnja proizvodnja čini 60% ukupne proizvodnje svih industrijskih enzima. Tradicionalno se koriste u prehrambenoj industriji i industriji deterdženata, dok je njihova primena u kožarskoj industriji i u terapeutske svrhe novijeg datuma.

Industrijski proteolitički enzimi se proizvode iz velikog broja različitih komercijalnih sojeva u zavisnosti od namene, dok se savremeni pristup zasniva na proizvodnji

rekombinantnih enzima tačno određenih svojstava za potrebe industrije deterdženata i druge. Najveće količine proteaza se proizvode pomoću mikroorganizama i to ekstracelularno, ali su još uvek od komercijalnog značaja i neke proteaze biljnog i životinjskog porekla (Tabela 5.3). Najveći svetski proizvođači proteaza su Danska (Novozymes), Holandija (Gist - Brocades) i SAD (Genencor International) [276].

Tabela 5.3. Pregled izvora proteaza i njihova industrijska primena [304]

Poreklo proteaza	Tip proteaze	Oblast primene
Bakterije		
<i>Bacillus licheniformis</i>	Alkalna	Proizvodnja deterdženata
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Alkalna	Proizvodnja deterdženata
<i>Bacillus megaterium</i>	Alkalna	Proizvodnja deterdženata
<i>Bacillus pumilis</i>	Alkalna	Proizvodnja deterdženata
<i>Bacillus subtilis</i>	Neutralna	Prerada kože/prehrambena industrija
<i>Bacillus cereus</i>	Neutralna	Prerada kože/prehrambena industrija
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Neutralna	Prerada kože/prehrambena industrija
<i>Streptomyces griseus</i>	Alkalna, Neutralna	Proizvodnja deterdženata, prerada kože, prehrambena industrija
Plesni		
<i>Aspergillus niger</i>	Alkalna	Proizvodnja deterdženata
<i>Aspergillus sojae</i>	Alkalna, Neutralna	Proizvodnja deterdženata, prerada kože, prehrambena industrija
<i>Aspergillus oryzae</i>	Alkalna, Neutralna	Proizvodnja deterdženata, prerada kože, prehrambena industrija
<i>Aspergillus flavus</i>	Alkalna	Proizvodnja deterdženata
<i>Mucor miehei</i>	Kisela	Prehrambena i farmaceutska industrija
<i>Mucor pusillus</i>	Kisela	Prehrambena i farmaceutska industrija
<i>Endothia parasitica</i>	Kisela	Prehrambena i farmaceutska industrija

Biljne proteaze		
<i>Papaja (Carica papaya)</i>	Papain, neutralna	Zrenje mesa, bistrenje piva, štavljenje kože, mlečna industrija, pekarstvo
<i>Smokva (Ficus carica)</i>	Ficin, neutralna	Zrenje mesa
<i>Ananas (Ananas comosus)</i>	Bromelin, neutralna	Pekarstvo, bistrenje piva, proizvodnja kozmetičkih proizvoda
Životinjske proteaze		
Želudac teleta, jagnjeta, jareta	Pepsin, kisela	Proizvodnja sira
Želudac teleta, jareta, jagnjeta	Renin, kisela	Proizvodnja sira
Svinjski pankreas	Tripsin, himotripsin, neutralne	Prerada kože

5.3.1. Osnovna svojstva i klasifikacija proteaza

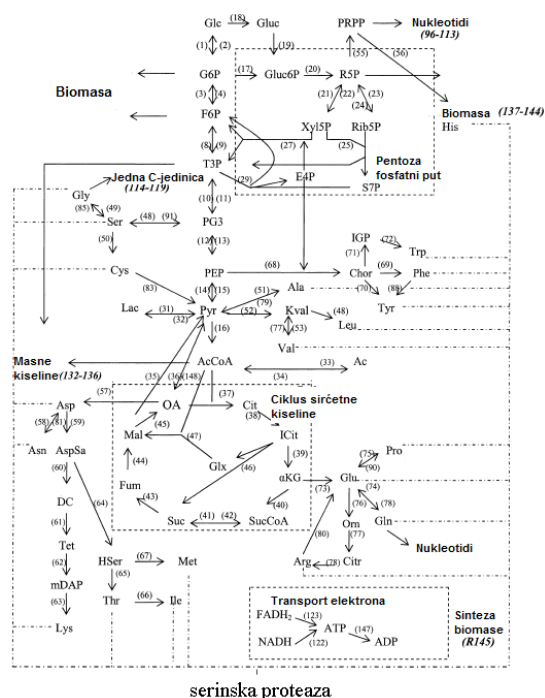
Klasifikacija proteolitičkih enzima se može izvršiti na osnovu više kriterijuma, a to su: pozicija peptidne veze u molekulu proteina na koju deluju, struktura aktivnog centra i mehanizam delovanja, kao i pH vrednost pri kojoj deluju.

Na osnovu pozicije peptidne veze u molekulu proteina koju hidrolizuju, proteaze se dele na egzopeptidaze i endopeptidaze. Egzopeptidaze dejstvuju na krajevima peptidnih lanaca odvajajući postepeno pojedine aminokiseline i na taj način progresivno skraćuju peptidne lance, dok endopeptidaze dejstvuju u unutrašnjosti molekula proteina, često na određenoj udaljenosti od terminalne amino- ili karboksilne grupe i razlažu proteine nasumično na peptide manje molekulske mase.

Neke endopeptidaze su nespecifične i hidrolizuju peptidnu vezu između bilo koje dve aminokiseline, dok su druge strogo specifične prema određenim aminokiselinama. Na primer, tripsin raskida peptidnu vezu samo (na C-terminalnom kraju) posle lizina i arginina kao osnovne aminokiseline, dok himotripsin ima afinitet ka hidrofobnim aminokiselinama kao što su fenilalanin, tirozin i triptofan, a često i leucin i metionin (Slika 5.1). Ove razlike u specifičnosti zavise od prirode aktivnog centra proteaza i od aminokiselina koje učestvuju u stvaranju veza sa supstratom [304,305].

Serinske proteaze uglavnom sintetišu ćelije u obliku neaktivnog prethodnika proenzima ili zimogena koji se moraju prevesti u aktivni oblik uklanjanjem dela peptidnog lanca koji maskira aktivni centar enzima. Tako, na primer, himotripsin sintetišu ćelije pankreasa u obliku neaktivnog prethodnika, himotripsinogena, koji se izlučuje kao takav u duodenum i tamo prevodi u aktivni oblik pomoću tripsina ili neke druge proteaze. Isti slučaj je i sa ostalim enzimima: tripsin sintetišu ćelije pankreasa u obliku neaktivnog prekursora, tripsinogena; elastaza se takođe dobija iz svog prekursora, proelastaze [276,309].

Metabolički put sinteze serinske proteaze iz *Bacillus lichemiformis* prikazan je na Slici 5.3.



Slika 5.3. Metabolički put sinteze serinske proteaze iz *Bacillus lichemiformis* [310]

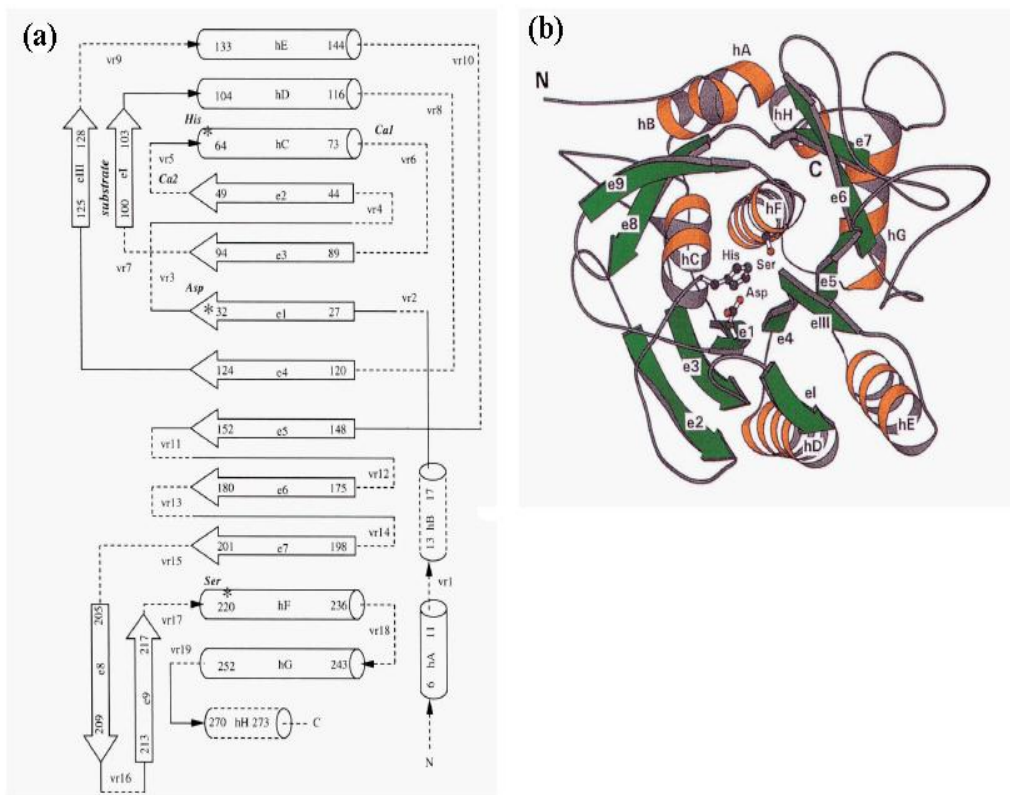
Glavnu ulogu u katalitičkom mehanizmu serinskih proteaza igra „katalitička trojka“ koja se nalazi u aktivnom centru enzima svih serinskih proteaza. Ova trojka se sastoji od tri esencijalne aminokiseline: histidina (His 57), serina (Ser 195) i aspartanske kiseline (Asp 102). Svaka od ove tri ključne aminokiseline igra bitnu ulogu u procesu raskidanja peptidnih veza. Npr. -OH grupa serina se ponaša kao nukleofil koji napada ugljenikov atom karbonilne grupe koja učestvuje u formiranju kovalentne veze između enzima u supstrata, dok slobodni elektronski par na azotovom atomu histidina ima sposobnost da prihvati vodonikov atom iz -OH grupe serina, koordinirajući tako napad na peptidnu vezu. Ove

aminokiseline su u peptidnom lancu udaljene jedna od druge, ali se prilikom uvijanja peptida približavaju jedna drugoj i nalaze se u samom srcu enzima, u njegovom aktivnom centru [310].

Mehanizam dejstva serinskih proteaza počinje formiranjem kovalentnog enzim-supstrat kompleksa u toku reakcije acilacije koja dovodi do gubitka odgovarajućih aminokiselina ili peptidnih fragmenata, a zatim dolazi do nukleofilnog napada molekula vode na novonastali intermedijar (ES kompleks), pri čemu dolazi do deacetilacije i završetka hidrolize peptida. Reakcija katalize sledi ping-pong mehanizam u kojoj prvo dolazi do vezivanja supstrata, zatim se oslobađa proizvod, pa se nakon toga vezuje drugi supstrat (u ovom slučaju voda) i oslobađa se još jedan proizvod reakcije [311].

Izučavajući strukturu serinskih proteaza utvrđeno je da one sadrže više od 1775 aminokiselinskih ostataka, pri čemu N-terminalni katalitički domeni sadrže od 268 do 511, a signalni peptidi od 27 do 280 aminokiselinskih ostataka. Za sve subtilaze je moguće definisati jezgro strukture samog katalitičkog domena čak i kada se uzmu u obzir različite varijante koje su moguće u glavnim lancima kao rezultat umetanja ili isecanja nekih aminokiselinskih sekvenci (Slika 5.4). Imajući u vidu ova razmatranja jasno je da su svoj doprinos utvrđivanju strukture serinskih proteaza dale tehnike proteinskog inženjerstva koje su nam dale odgovore i na pitanje stabilnosti ovih enzima, njihove katalitičke aktivnosti i specifičnosti prema supstratu. Od 1991. godine otkiveno je više od 100 novih subtilaza, a danas se i dalje radi na identifikaciji novih iz različitih izvora [312,313].

Serinske proteaze se mogu dalje deliti na različite familije na osnovu strukturnih sličnosti, ali sa praktičnog aspekta bakterijski subtilizin je podgrupa serinskih proteaza od najvećeg industrijskog značaja. Prva identifikovana DNK sekvenca je bila za subtilizin iz *Bacillus amyloliquefaciens* koji je dobio naziv Subtilizin BPN. Od tada su otkrivene i DNK sekvence mnogih drugih subtilizina i serinskih proteaza, kao što su Subtilizin E iz *Bacillus subtilis*, Subtilizin Karlzberg iz *Bacillus licheniformis*, Subtilizin NAT iz *Bacillus subtilis* kao i serinske proteaze iz *Bacillus alcalophilus* PB92 [314].



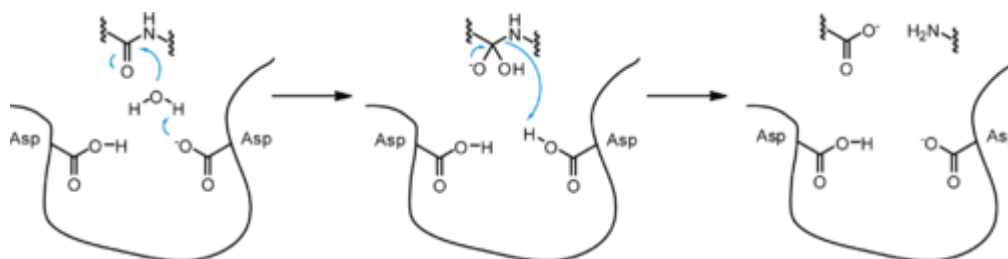
Slika 5.4. (a) Šematski prikaz topologije sekundarne strukture subtilizina, α -heliks je predstavljen cilindrima, a β -naborana struktura je predstavljena u formi strelica. Pune linije ukazuju na očuvane domene, a isprekidane na varijabilne domene. Katalitička trojka je označena *, a mesto vezivanja supstrata je između lanaca eI i eIII. (b) Sekundarna i tercijarna struktura subtilizina. Bočni lanci katalitičkih ostataka su prikazani u obliku loptice i štapa [315]

5.3.1.3. Aspartatne proteaze

Aspartatne proteaze (EC 3.4.23) su grupa kiselih proteaza čiji aktivni centar sadrži ostatke asparaginske kiseline. Veliki broj ovih enzima ima molekulska masu u opsegu od 30 do 45 kDa i pokazuju maksimalnu aktivnost u kiseljoj sredini pri pH vrednosti 3 - 4,5. Ova grupa enzima ima potpuno drugačiju strukturu od serinskih proteaza. Dva ostatka asparaginske kiseline, nekad na različitim subjedinicama, učestvuju u reakcionom mehanizmu [276].

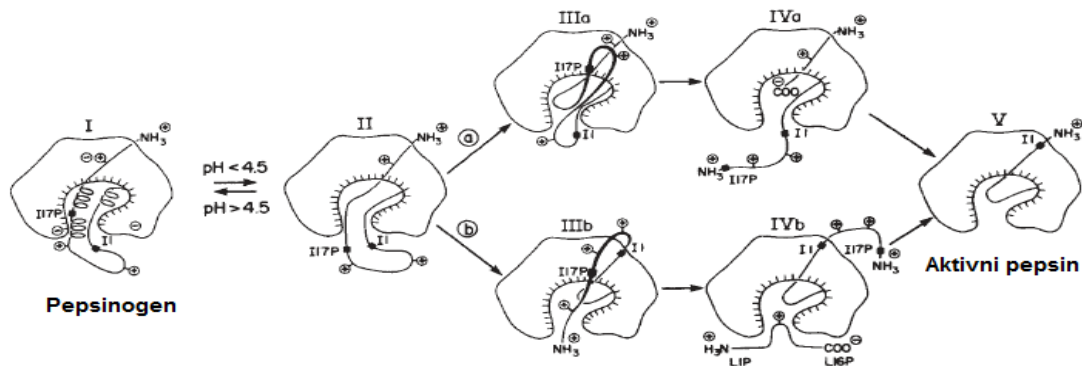
Aspartatne proteaze su visoko specifična familija proteaza koja ima sposobnost cepanja dipeptidnih veza sa hidrofobnim aminokiselinskim ostacima, kao i onih sa beta-

metilenskom grupom. Za razliku od drugih proteaza, one ne formiraju kovalentni intermedijar tokom reakcije hidrolize. Predloženo je dosta različitih katalitičkih mehanizama za ove proteaze, ali je najviše prihvaćen kiselo-bazni mehanizam koji uključuje smeštanje molekula vode između dva aspartatna ostatka. Jedan aspartat aktivira vodu izdvajanjem protona, onemogućavajući molekulu vode da napadne karbonilni ugljenikov atom supstrata koji učestvuje u formiranju kovalentne veze, stvarajući tetraedarski intermedijar u formi oksianjona. Reorganizacija intermedijara dovodi do protonizacije amidnog azota molekula supstrata i oslobađanja odgovarajuće aminokiselinske sekvence (Slika 5.5) [316].



Slika 5.5. Predloženi mehanizam hidrolize peptidne veze pomoću aspartatnih proteaza [317]

Pepsin i renin su najpoznatiji predstavnici takozvanih životinjskih stomačnih enzima. Pepsin luče periferne žlezde želudačne sluzokože u obliku neaktivnog pepsinogena koji se aktivira pod uticajem hlorovodonične kiseline želudačnog soka ili u prisustvu tragova aktivnog pepsina, tj. autokatalitički. Aktivacija pepsinogena se postiže spuštanjem pH vrednosti ispod 4,5 koja prouzrokuje niz promena u strukturi veza i dovodi do formiranja molekula pepsina (Slika 5.6). Renin i himozin se stvaraju iz prorenina u želucu odojčadi i mladih dok se hrane mlekom, a naročito u sirištu (četvrtom delu želuca) mladih preživara odakle se i dobija. Enzim vrlo intenzivno zgrušava mleko. Mikrobne aspartatne proteaze se proizvode uglavnom iz *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* i *Mucor* sojeva i do sada njihova najveća primena je u industriji sira [276].



Slika 5.6. Šematski prikaz aktivacije pepsinogena u pepsin [318]

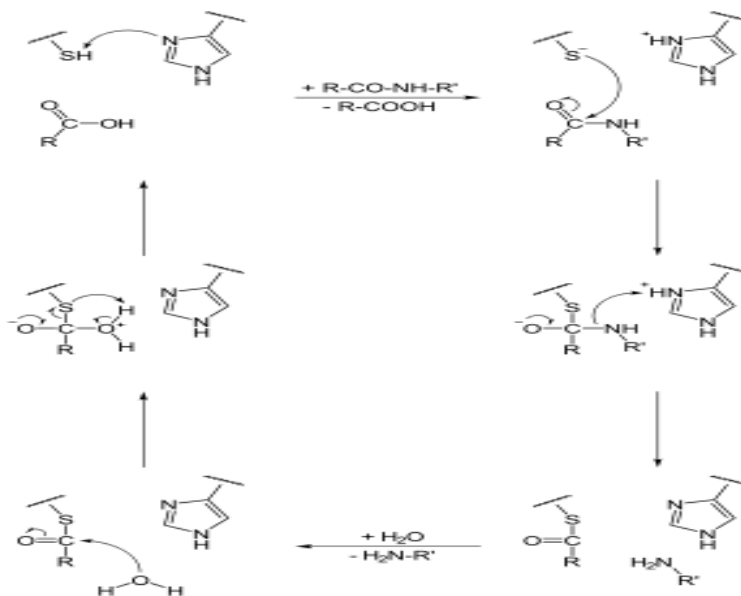
5.3.1.4. Cisteinske proteaze

Cisteinske proteaze (EC 3.4.22) su veoma rasprostranjene u prirodi i karakteristične su po tome što u sastav njihov aktivnog centra ulaze ostaci dve aminokiseline, cisteina i histidina, koje su od esencijalne važnosti za njihovu katalitičku aktivnost. Cisteinske proteaze, među kojima su predstavnici papain, ficin i bromelin, su poznate kao biljne proteaze, jer su rasprostranjene u sokovima i tkivima biljaka.

Jedna od najvažnijih karakteristika cisteinskih proteaza jeste da postaju aktivne pod uticajem određenih redukcionih agenasa (cistein, glutation, vodonik-sulfid, askorbinska kiselina itd.) i da imaju najveću aktivnost u neutralnoj sredini. Utvrđeno je da svi aktivatori papaina imaju sposobnost da redukuju disulfidne veze. U isto vreme jedinjenja koja oksidišu sulfhidrilne grupe (jod, vodonik-peroksid) inhibiraju aktivnost papaina. Na osnovu ovoga zaključuje se da je za katalitičku aktivnost papaina neophodno prisustvo slobodne sulfhidrilne grupe u molekulu. Mehanizmi delovanja papaina i nekih serinskih proteaza su slični, s tom razlikom što kod papaina dolazi do stvaranja tioacil-enzim kompleksa kao kovalentnog intermedijara. Nukleofilnost -SH grupe je povećana susednim ostatkom His159 koji ujedno igra ulogu akceptora protona. Pored sulfhidrilne grupe, utvrđeno je da je za aktivnost enzima od esencijalne važnosti prisustvo karboksilne grupe u disosovanom obliku. Ove proteaze pokazuju najveću aktivnost u neutralnoj sredini i koriste se u prehrambenoj industriji, uglavnom u proizvodnji mesa i mesnih prerađevina [276,319].

Prvi korak u katalitičkom mehanizmu hidrolize peptidne veze jeste deprotonizacija tiolne grupe aktivnog centra enzima od strane susedne aminokiseline koja u bočnom lancu sadrži ostatak histidina. Sledeći korak je nukleofilni napad deprotonovanog cisteinskog

anjonskog sumpora na karbonilni ugljenikov atom supstrata. U ovom koraku dolazi do oslobađanja fragmenta supstrata sa N-terminusa, histidinski ostaci proteaze se ponovo vraćaju u svoj deprotonizovani oblik, a tioestar (intermedijar) učestvuje u vezivanju novog C-terminusa supstrata (Slika 5.7) [320].



Slika 5.7. Šematski prikaz reakcionog mehanizma cisteinskih proteaza [320]

5.3.1.5. Metalo - proteaze

Metalo - proteaze su grupa proteaza karakteristična po tome što im je za katalitičku aktivnost od esencijalne važnosti prisustvo dvovalentnih jona Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} i drugih. Drugim rečima, agensi koji reaguju sa metalima, kao što su 1,10-fenantrolin, citrat, polifosfati i drugi, inhibiraju metalo - proteaze. Metal može biti labavo vezan sa proteinskim delom enzima i lako se može od njega odvojiti. Ovo je slučaj kod leucin-aminopeptidaze, glicilglicin-dipeptidaza i drugih.

Druga podgrupa proteolitičkih enzima ove grupe sadrži u molekulu metal koji je čvrsto vezan sa proteinskim delom enzima. U takve enzime spadaju karboksipeptidaze, koje u molekulu sadrže čvrsto vezani dvovalentni cink koji učestvuje u reakciji sa supstratom. Veliki broj metalo - proteaza pokazuje maksimalnu aktivnost u neutralnoj do alkalnoj sredini. Najpoznatiji predstavnik ove podgrupe enzima je mikrobnii termolizin, termostabilna neutralna proteaza koja ima veliki industrijski značaj u proizvodnji veštačkih zaslađivača [321].

5.4. Proteaze za hidrolizu proteina belanceta

Pregledajući dostupnu literaturu može se izneti zaključak da se prilikom hidrolize proteina belanceta najčešće koriste egzo- i endo-peptidaze, kao što su proteza iz *Bacillus licheniformis*, proteaza iz *Bacillus amyloliquefaciens*, papain, tripsin, pepsin, proteaze iz *Aspergillus oryzae*, pri čemu su istraživači u najvećem broju eksperimenata koristili komercijalne preparate enzima. Na osnovu literature, za ovo istraživanje odabrane su proteaze o kojima će biti reči u tekstu koji sledi.

5.4.1. Alkalaza, proteaza iz *Bacillus licheniformis*

Alkalaza (*na engl.* Alcalase® 2,4 L, sinonimi: Proteinase from *Bacillus licheniformis*, Subtilisin A, Subtilisin Carlsberg) je ime komercijalne alkalne proteaze kompanije Novozymes koja je izolovana je iz bakterije *Bacillus licheniformis*. Nezaštićeno ime ovog enzima je subtilizin, sa oznakom EC 3.4.21.62. Pripada grupi serin-endopeptidaza koje napadaju peptidnu vezu nukleofilnim delovanjem serinskog centra. Aktivna je na pH između 6,5 i 8,5, a pH optimum joj je oko 8. Preporučuje se da se čuva na temperaturi od 2-8 °C [322]. Temperaturni optimum je u opsegu 55-60 °C, a vrednost izoelektrične tačke je 9,4. Može da hidrolizuje native i denaturisane proteine i pripada grupi ekstracelularnih serin-proteaza. Alkalaza poseduje široku specifičnost prema peptidnim vezama, a prednost imaju nepromenjeni ostaci u položaju P1 peptidne veze od P1-P10, koji reaguju sa katalitičkim centrom serin-proteaze u kojoj je prema nomenklaturi Šehtera (Schechter) i Bergera (Berger) (1967) N-terminalni kraj označen kao P3, P2, P1, a C-terminalni kraj sa P1', P2', P3' itd. [59]. U okviru ove disertacije, eksperimentalni uslovi pri kojima je izvođena jednostepena i dvostepena hidroliza belanceta alkalazom su bili temperatura 50 °C i vrednost pH 8,0.

Upotrebom rendgenskog zračenja za ispitivanje strukture ovog enzima ustanovljeno je da se sastoji od 275 aminokiselinskih ostataka, a da samu strukturu čine nekoliko α -heliksa i veliki broj β -naboranih ploča. Strukturno, ovaj enzim nema nikakve veze sa himotripsinom, takođe serinskom proteazom, ali himotripsin i Subtilizin Carlsberg imaju istu katalitičku trijadu u aktivnom centru. Naime, aktivni centar subtilizina čine aminokiseline Asp32, His64 i Ser221 koje obrazuju katalitičku trijadu. Iako su

aminokiseline Asp32, His64 i Ser221 po položaju u molekulu daleko, prilikom obrazovanja trodimenzionalne strukture one se približavaju i obrazuju aktivni centar enzima.

Mehanizam delovanja subtilizina koji katalizuje hidrolizu peptidne veze se sastoji iz nekoliko faza. Prvo, iz karboksilne grupe Asp32 predaje se proton azotu u imidazolovom prstenu His64. Ovo je moguće pošto je asparaginska kiselina negativno naelektrisana pri pH vrednosti 7,40 (fiziološka pH). Drugi atom azota iz His-64 reaguje sa O-H iz Ser221, pri čemu se raskida veza O-H, i nastaje nukleofilni kiseonik. Zatim sledi nukleofilni napad deprotonovanog kiseonika Ser221 na karbonilnu grupu peptidne veze supstrata koja se hidrolizuje. Kao rezultat navedenih reakcija, formira se tetraedarni intermedijar. Peptidna veza obrazovana između C- i N atoma raskida se nakon formiranja tetraedarnog intermedijara i proton sa intermedijara pomera se ka His64, pa ostaje stabilan acil-enzim intermedijar. Zatim molekul vode predaje proton His64 i negativno naelektrisan kiseonik vezuje se za ugljenik iz karbonilne grupe C-terminalnog kraja peptida i ponovo se obrazuje tetraedalni intermedijar. U poslednjoj reakciji, obrazovana veza između Ser221 i karbonilnog kiseonika se raskida, pa proton reaguje sa azotom iz His64 i histidin se stabilizuje, dok se negativno naelektrisan ugljenik iz karbonilne grupe stabilizuje obrazovanjem dvostruke veze sa kiseonikom. Kao rezultat, C-terminalni kraj peptida se uklanja [323].

Trodimenzijsku kristalnu strukturu subtilizina istraživači su odredili u anhidrovanom dioksanu primenom X-zračenja na 2,6 Å rezoluciji i izvršili upoređivanje dobijene strukture sa strukturom subtilizina u vodi i acetonitrilu. Tom prilikom istraživači su ustanovili da nema značajnih razlika u dobijenim strukturama, s tim da su veoma male promene uočene u konformaciji stolice između dioksana i vode, ali te promene su iste kao i promene koje se poštuju između struktura jedinjenja u različitim vodenim sredinama [324].

5.4.2. Flevorzim, proteaza iz *Aspergillus oryzae*

Flevorzim (*na engl.* Flavourzyme® 500 L) je ime komercijalne proteaze kompanije Novozymes, koja je poznata i kao ekstracelularna leucil-aminopeptidaza i zavedena je pod oznakom EC 3.4.11.1. Flevorzim je proteaza koja ima endo- i egzo-peptidaznu aktivnost i izolovana je iz plesni *Aspergillus oryzae*. Njen temperaturni optimum je u opsegu 45-50 °C, dok se pH optimum nalazi između vrednosti 5-7 [325]. Pre svega, flevorzim hidrolizuje ostatke leucina u N-terminalnom kraju peptida i proteina. Generalno, hidroliza ovom

proteazom dovodi do oslobađanja N-terminalne aminokiseline u sekvencionalnom redosledu Xaa⁺ Yaa⁻, u kome Xaa⁺ predstavlja prvu hidrolizovanu aminokiselinu, a poželjno je da to bude leucin (Leu) ili neka druga aminokiselina uključujući i prolin (Pro), ali ne i arginin (Arg) i lizin (Lys). Yaa⁻ predstavlja drugu hidrolizovanu aminokiselinu i to najčešće može biti prolin (Pro). Takođe, flevorzim lako hidrolizuje i amide aminokiselina, kao i metil estre, s tim što je prinos arilamida izuzetno nizak. Enzim je aktivan u prisustvu jona metala kao što su Zn²⁺, Mg²⁺ i Mn²⁺ [59, 326]. Pregledom dostupne literature može se reći da pravi mehanizam delovanja ove leucin-aminopetidaze još nije utvrđen, dok je mehanizam za goveđu leucin-aminopeptidazu i onu izolovanu iz *Escherichia coli* utvrđen [327,328].

Tokom ovog istraživanja hidroliza proteina belanceta ovom proteazom izvođena je pri rekacionim uslovima 50 °C i pH 7,0.

5.4.3. Neutraza, proteaza iz *Bacillus amyloliquefaciens*

Neutraza (*na engl.* Neutrase® 0.8 L) je komercijalno ime izuzetno stabilne nespecifične Zn-endoproteaze izolovane iz *Bacillus amyloliquefaciens*, kompanije Novozymes. Takođe, ona se naziva bacilolizin i ima oznaku EC 3.4.24.28. To je neutralna ekstracelularna proteaza koja sadrži jedan atom cinka po molekulu. Cink se lako uklanja helatnim sredstvima (npr. EDTA). Ca²⁺ jon je detektovan u prečišćenom enzimu i veruje se da ima ulogu u održavanju strukture i oblika i da sprečava autolizu enzima. Ovaj jon u molekulu enzima vezan je za amonokiseline ligandima, a to su His392, His396, Glu416, a za katalitičku aktivnost potreban je najmanje još jedan kiselinski ostatak koji će imati ulogu elektrofila Glu-393 [329,330]. U mehanizmu delovanja ove metaloproteaze nukleofil je aktiviran molekul vode. Optimalan pH je između 6,0 i 7,0. Aktivatori su joni Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺ i Al³⁺ [331,332].

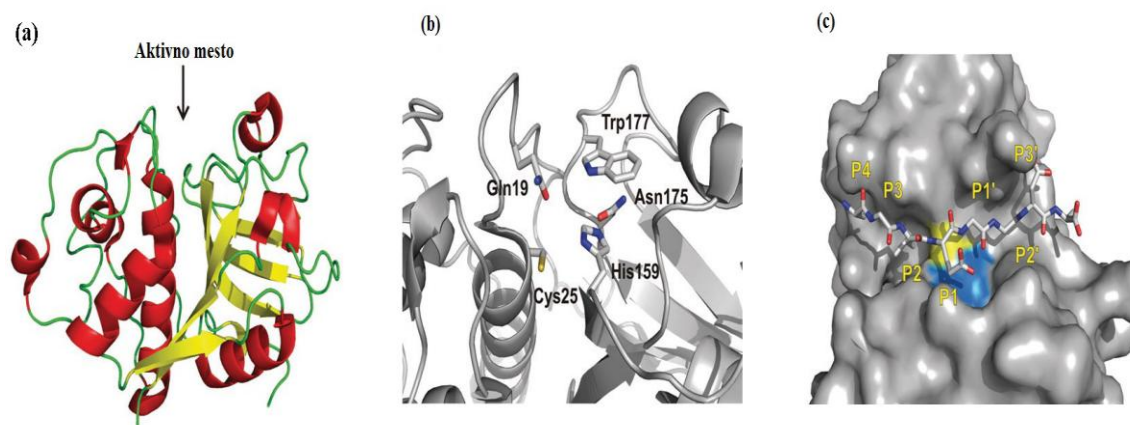
U ovoj doktorskoj disertaciji, hidroliza belanceta pomoću neutraze izvedena je pri eksperimentalnim uslovima temperature 50 °C i pH vrednosti 7,0, koji ujedno predstavljaju optimalne uslove za navedenu proteazu.

5.4.4. Papain, proteaza iz *Carica papaya*

Papain pripada grupi cisteinskih proteaza (EC 3.4.22.2) koje se dele na endo- i aminopeptidaze i pokazuje široku specifičnost. Prisutan je u papaji, a pripadnici familije

cisteinskih proteaza pronadjeni su i u bacilovirusima, eubakterijama, kvascima, biljkama i sisarima. Ovaj enzim se sastoji od jednog polipeptidnog lanca u čijem sastavu se nalaze tri disulfidna mosta i sulfhidrina grupa u aktivnom centru enzima. Naime, aktivno centar čini R-ostatak aminokiseline cisteina, koji deprotonovan nukleofilno napada karbonilni ugljenik peptidne veze, pri čemu se izdvaja N-terminalni kraj. Ima veliku specifičnost prema peptidnoj vezi u molekulima proteina, i to favorizuje bočne lance u položaju P2 koji sadrže veliki broj hidrofobnih ostataka aminokiselina. Optimalna pH vrednost je između 6 i 7, a optimalna temperatura je 65 °C [333,334].

Polipeptidni lanac papaina sastoji se od 212 aminokiselinskih ostataka [335,336]. Na osnovu trodimenzionalne stukture uočava se da se papain sastoji od dva domena između kojih se nalazi tzv. pukotina u kojoj je smešten aktivni centar (Slika 5.8a). Stukturu molekula papaina čine α -heliksi i jedna antiparalelna β -naborana ploča. Ispitivanjem stukture papaina u vodenom rastvoru u prisustvu SDS-a uočen je veliki broj α -heliksa (spirirlnih delova molekula) usled jakog elektrostatičkog privlačenja [337].



Slika 8.5. 3D struktura papaina u standardnoj orijentaciji (aktivno mesto je naznačeno strelicom) (a), katalitička dijada sa ostacima Asn175, Gln19 i Trp177 (b) i kompjuterski model površinske orijentacije oktapeptida vezanog za aktivni centar humanog katepsina K (c) [333]

Katalitički mehanizam dejstva je sličan mehanizmu dejstva serinskih proteaza. Aktivni centar papaina čini katalitička dijada Cys25, His159, a za Asn158 dugo je smatrano da ima učešća u mehanizmu delovanja aktivnog centra papaina, ali je takvo mišljenje opovrgnuto. Postoje, takođe, nekoliko dodatnih aminokiselinskih ostataka koji su neophodni za katalitičku funkciju papaina (Slika 5.8b). Ostaci Asn175 i Gln19 su neophodni za pravilno

pozicioniranje katalitičke dijade. Nedavni dokazi, međutim, sugerišu i važnu ulogu susednog Trp177 u generaciji nukleofilnog karaktera katalitičke dijade. Aktivni centar prostire se preko cele gornje strane molekula, a vezivanje supstrata se odigrava kada se molekul nalazi u produženoj konformaciji po modelu vezivanja oktapeptida Ala-Gly-Leu-Glu-Gly-Gly-Asp-Ala unutar aktivnog centra humanog katepsina K (Slika 5.8c). Na slici su prikazani ostaci supstrata u poziciji P4 i P3', koji interaguje sa odgovarajućim vezujućim mestima enzima (S4 preko S3') i katalitički ostaci Cys25 i His159 su naznačeni žutom i plavom bojom, redom [333].

EKSPERIMENTALNI DEO

6. MATERIJALI I METODE

6.1. Materijali

U ovom radu kao supstrat korišćena su belanca jaja proizvođača Banatsko Novo selo, marke "Timok".

Enzimi korišćeni za reakciju hidrolize proteina belanceta su sledeći:

- Proteaza iz *Aspergillus oryzae*, Sigma - Aldrich, St. Louis, SAD (flevorzim);
- Proteaza iz *Bacillus amyloliquefaciens*, Sigma - Aldrich, St. Louis, SAD (neutraza);
- Proteaza iz *Bacillus licheniformis*, Subtilisin R Carlsberg, Sigma - Aldrich, St. Louis, SAD (alkalaza);
- Proteaza iz *Carica papaya*, Sigma - Aldrich, St. Louis, SAD (papain).

Mikrobne kulture koje su se koristile za mikrobiološke analize uzoraka su:

- *Enterobacteriaceae*
- *Salmonella enteritidis*

Ostale hemikalije koje su korišćenje za ispitivanja funkcionalnih svojstava, kao i pripremu potrebnih reagenasa su:

- 5,5'- (ditiobis - 2 - nitrobenzoeva kiselina), DTNB, Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
- 8-anilino-1-naftalensulfonska kiselina (ANS), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK,
- akrilamid (C_3H_5NO), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK,
- amonijum-persulfat ($H_8N_2O_8S_2$) (APS), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK,
- bakar (II)-sulfat pentahidrat ($CuSO_4 \times 5H_2O$), Zorka Pharma, Šabac, Srbija,
- bromfenol plavo ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK,
- dinatrijumhidrogen-fosfat (Na_2HPO_4), Centrohem, Srbija,
- EE bujon (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd, Mumbaj, India),
- etanol (C_2H_6O), Zorka Pharma, Šabac, Srbija,
- etilendiamintetrasirćetna kiselina ($C_{10}H_{16}N_2O_8$), Lachema, Czech Republic,
- Folin Ciocalteu reagens, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD,
- glicin (NH_2CH_2COOH), Biochemica, Sigma-Aldrich Chemi GmbH, China,

- gvožđe (III)-hlorid (FeCl_3), Analytika, Czech Republic,
- hlorovodonična kiselina (HCl), Lachner, Czech Republic,
- kalijum (III)-heksacijanoferat ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), Merck, Germany,
- kalijum-natrijum tartarat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$), Merck, Darmstadt, Germany,
- metanol (CH_3OH), Lachema, Czech Republic,
- Muller-Kauffman tetratonat novobiocin bujon (MKTTn) (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd, Mumbaj, India),
- natrijum-fosfat (NaH_2PO_4), Centrohem, Srbija,
- natrijum-hidroksid (NaOH), Lachner, Czech Republic,
- natrijum-hlorid (NaCl), Lachema, Czech Republic,
- natrijum-karbonat (Na_2CO_3), Lachema, Czech Republic,
- proteinski markeri za SDS-PAGE elektroforezu molekulske mase u opsegu 14,4-116 kDa, Thermo scientific, Litvanija,
- sojin bujon (RSV), HiMedia Laboratories Pvt.Ltd, Mumbaj, India,
- trihlorsirćetna kiselina (CCl_3COOH), Lachema, Czech Republic,
- tris-(hidroksimetil)-aminometan ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$), Centrohem, Stara Pazova, Srbija,
- urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), Zorka, Šabac, Srbija,
- VRBG agar, HiMedia Laboratories Pvt.Ltd, Mumbaj, India,
- XLD agar, HiMedia Laboratories Pvt.Ltd, Mumbaj, India,

6.2. Instrumenti

- ATR-FTIR spektrofotometar (IRAffinity-1, Shimadzu, Japan),
- centrifuga (SIGMA 2-16, rotor 12141, Nemačka),
- centrifuga miniSpin (Eppendorf, Hamburg, Nemačka),
- homogenizator (Yellowline, DI 25 basic, Ica Works Inc., Wilmington, 600 W, 50 V, 8000-24000 rpm),
- magnetna mešalica sa regulacijom temperature (C-MAG HS 7, IKA, Nemačka),
- pH-metar (Eutech instrument, Holandija),
- propelerska mešalica sa četiri propelera (Heidolph RZR 2020, Nemačka),

- Ramanov spektrometar (XploRa Raman Horiba Jobin Yvon).
- skenirajući elektronski mikroskop sa emisijom polja (Mira 3 XMU, Češka Republika),
- spektrofluorimetar (Horiba FluoroMax-4, HORIBA, Jobin Yvon)
- sprej drajer (Büchi Dryer B-290, Büchi, Švajcarska),
- ultrazvučna sonda, (Bandelin Sonopuls HD 2200, Berlin, Nemačka),
- ultrazvučno kupatilo (Bandelin electronic, sonorex digitec, DT 102 H, Nemačka),
- ultrazvučno kupatilo, (Ei Niš-Ro-Vep, Niš, Srbija),
- uređaj za vertikalnu elektroforezu (LKB SE 600 Ruby, Power Supply EPS601, Amershom Bioscience),
- UV/vis spektrofotometar (Ultrospec 3300 pro, Amersham Bioscience),
- vodeno kupatilo sa tresilicom (WB-20, Memerkt, Schwabach, Nemačka),
- zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Velika Britanija).

6.3. Metode

6.3.1. Pretretman rastvora belanceta ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz

10%-tni vodeni rastvori belanceta su bili pretretirani ultrazvučnim talasima visokog intenziteta (frekvence $20 \pm 0,2$ kHz i snage 40%) pomoću ultrazvučne sonde¹. Kao izvor ultrazvučnih talasa korišćena je titanijumska sonotroda prečnika 13 mm koja je bila uronjena u čašu sa uzorkom sa čijeg vrha su se ultrazvučni talasi direktno prenosili u medijum. Sonotroda je bila uronjena unutar medijuma na dubini od 53 ± 1 mm ispod gornjeg meniska vode. Uzorci su pretretirani u staklenom reakcionom sudu sa vodenim plaštom zapremine 300 ml. Zapremina uzoraka je bila konstantna u svim eksperimentima i iznosila je 180 ml. Temperatura se održavala konstantnom tokom soniciranja (25 ± 1 °C) proticanjem termostatirane vode kroz vodeni plašt reakcionog suda. Protok vode iznosio je od 5-10 ml/s. Snaga ultrazvuka izmerena je kolorimetrijskom metodom i izražena je u W.

¹ U daljem tekstu pretretman UZS-20kHz.

6.3.2. Pretretman rastvora belanceta ultrazvučnim kupatilom frekvence 40 kHz

10%-tni vodeni rastvori belanceta su bili pretretirani ultrazvučnim talasima visokog intenziteta u ultrazvučnom kupatilu frekvencije 40 kHz² (EINIS-RO-VEP, Niš, Srbija). Snaga generatora i grejna snaga su iznosile 600 W i 1200 W, redom. Unutrašnje dimenzije kupatila su bile 40 x 20 x 20 cm, spoljašnje dimenzije 46 x 36 x 33 cm, zapremina vode u kuptailu 6000 ml, a emitujuća površina 800 cm². Uzorci su pripremljeni u staklenoj čaši zapremine 600 ml. Zapremina uzoraka je bila konstantna u svim eksperimentima i iznosila je 360 ml. Proteini belanceta koji su naknadno hidrolizovani su pretretirani na dve različite temperature ($25 \pm 3,5$ °C i $55 \pm 3,5$ °C) tokom 15 min, 30 min i 60 min, dok su vodeni rastvori nativnih proteina belanceta bili tretirani pri konstantnoj temperaturi od 25 °C. Temperatura destilovane vode unutar kupatila konstantno je merena pomoću termopara sa digitalnim pokazivačem i na taj način se održavala konstantnom tokom celog pretretmana. Kao kontrola koristili su se 10%-tni vodeni rastvori belanceta koji su stajali u ultrazvučnom kupatilu frekvence 0 kHz na željenim temperaturama i tokom ispitivanog vremena pretretmana.

6.3.3. Pretretman rastvora belanceta ultrazvučnim kupatilom frekvence 35 kHz

10%-tni vodeni rastvori belanceta su bili pretretirani ultrazvučnim talasima visokog intenziteta u ultrazvučnom kupatilu frekvence 35 kHz³ (BENDELIN electronic, sonorex digitec, DT 102 H, Nemačka). Snaga generatora i grejna snaga su iznosile 480 W i 140 W, redom. Unutrašnje dimenzije kupatila su bile 24 x 14 x 10 cm, spoljašnje dimenzije 26 x 16 x 25, zapremina vode u kuptailu 1150 ml, a emitujuća površina 336 cm². Uzorci su pripremljeni u staklenoj čaši zapremine 600 ml. Zapremina uzoraka je bila konstantna u svim eksperimentima i iznosila je 360 ml. Proteini belanceta koji su naknadno hidrolizovani su pretretirani na dve različite temperature ($25 \pm 3,5$ °C i $55 \pm 3,5$ °C) tokom 15 min, 30 min i 60 min, dok su vodeni rastvori nativnih proteina belanceta bili tretirani pri konstantnoj temperaturi od 25 °C. Temperatura destilovane vode unutar kupatila konstantno je merena pomoću termopara sa digitalnim pokazivačem i na taj način se

² U daljem tekstu pretretman UZK-40kHz.

³ U daljem tekstu pretretman UZK-35kHz.

održavala konstantnom tokom celog pretretmana. Kao kontrola koristili su se 10%-tni vodeni rastvori belanceta koji su stajali u ultrazvučnom kupatilu frekvence 0 kHz na željenim temperaturama i tokom ispitivanog vremena pretretmana.

6.3.4. Određivanje snage ultrazvuka

Ultrazvučni talasi dovode do zagrevanja tretiranog medijuma, te je neophodno pratiti povećanje temperature u funkciji vremena kako bi se dobio podatak o vrednosti akustične snage (u W). Snaga ultrazvuka određena je kalorimetrijskom metodom. Uzorci su bili tretirani ultrazvučnim talasima (20 kHz, 35 kHz, 40 kHz) u odgovarajućim vremenskim intervalima (2, 5, 10, 15 i 20 min za 20 kHz i 15, 30 i 60 min za 40 i 35 kHz), a promena temperature u vremenu je merena termoparom sa digitalni pokazivačem. Vremenski interval očitavanja temperature zavisio je od dužine ultrazvučnog pretretmana. Snaga ultrazvuka izračunata je prema sledećoj jednačini [338]:

$$P = mC_p \left(\frac{dT}{dt} \right)_{t=0} \quad (6.1)$$

gde je m masa vode u kupatilu (g), C_p specifični toplotni kapacitet vode (4,18 kJ kg^oC) i (dT/dt) je početna brzina promene temeperature u vremenu nakon primenjenih ultrazvučnih tretmana (nagib prave dT/dt).

Izračunate vrednosti akustične snage ultrazvuka od 20 kHz, 35 kHz i 40 kHz su iznosile 35,4 W, 65,7 W, 21.3 W, redom.

6.3.5. Termički pretretman rastvora belanceta

U čaši je odmereno 36,0 grama belanceta i rastvoreno uz konstantno mešanje destilovanom vodom do 360 ml u cilju postizanja koncentracije od 10%. Uzorcima koji su nakon tretmana bili dalje hidrolizovani različitim proteazama, podešavana je željena pH vrednost dodatkom 0,2 M rastvora NaOH, dok su analize sa nativnim proteinima belanceta rađene na njihovom prirodnom pH koji se kreteo u granicama od 7,6 do 8,6 pH jedinica. Ovako pripremljeni uzorci su se tretirali toplotom na visokoj temperaturi od 75 °C uz stalno mešanje na mehaničkoj mešalici (240 ob/min) i održavanje konstantne temperature u toku 30 minuta primenom magnetne mešalice sa regulacijom temperature (C-MAG HS 7, IKA, Nemačka). Kontrolni uzorak je bio podvrgnut mešanju na sobnoj temperaturi pri istom broju obrtaja i vremenu pretretmana (240 ob/min, 30 min).

6.3.6. Jednostepena enzimska hidroliza proteina belanceta u šaržnom reaktoru sa mešanjem

Enzimska hidroliza proteina belanceta izvedena je u šaržnom reaktoru zapremine 360 ml sa mehaničkim mešanjem primenom propelerske mešalice sa četiri propelera (Heidolph RZR 2020, Nemačka). Balance (10%-tni rastvor) je rastvoreno u destilovanoj vodi (ili 10 mM rastvoru cisteina za hidrolizu papainom) uz konstantno mešanje i tretirano ultrazvučnim talasima (20 kHz, 35 kHz i 40 kHz) ili visokom temperaturom (75 °C, 30 min). Ovako tretiran uzorak supstrata termostatiran je uz konstantno mešanje na temperaturi 50 °C 20 minuta. Nakon termostatiranja uzorku je podešena odgovarajuća pH vrednost (u zavisnosti od korišćenog enzima), a potom dodat enzim. Ispitan je uticaj komercijalnih proteolitičkih enzima Alkalaze (Alcalase® 2,4 L), Neutrase (Neutrase® 0,8 L) i papaina (Papain iz *papaya latex*). Hidroliza je za svaki eksperiment izvođena pri optimalnim uslovima datim u Tabeli 6.1. Temperatura se održavala konstantnom tokom reakcije, a reakcija hidrolize je praćena pH-stat metodom, odnosno održavanjem konstantne vrednosti pH sa stalnim dodavanjem odgovarajuće količine 0,2 M rastvora NaOH. pH-stat metoda zasniva se na činjenici da se tokom hidrolize proteina belanceta broj slobodnih α -amino i karbonilnih grupa povećava [339]. Broj raskinutih peptidnih veza je direktno proporcionalan potrošnji baze. Kraj hidrolize označava momenat kada više nije neophodno dodavati bazu za podešavanje pH vrednost nakon čega se reakcija zaustavlja zagrevanjem uzoraka na 95 °C tokom 15 min kako bi se enzim deaktivirao. Posle deaktivacije enzima, uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu i centrifugirani na 12,000×g 10 min. Supernatanti su dekantovani i čuvani na 4 °C za dalje analize.

Stepen hidrolize (SH) izračunava se prema jednačini:

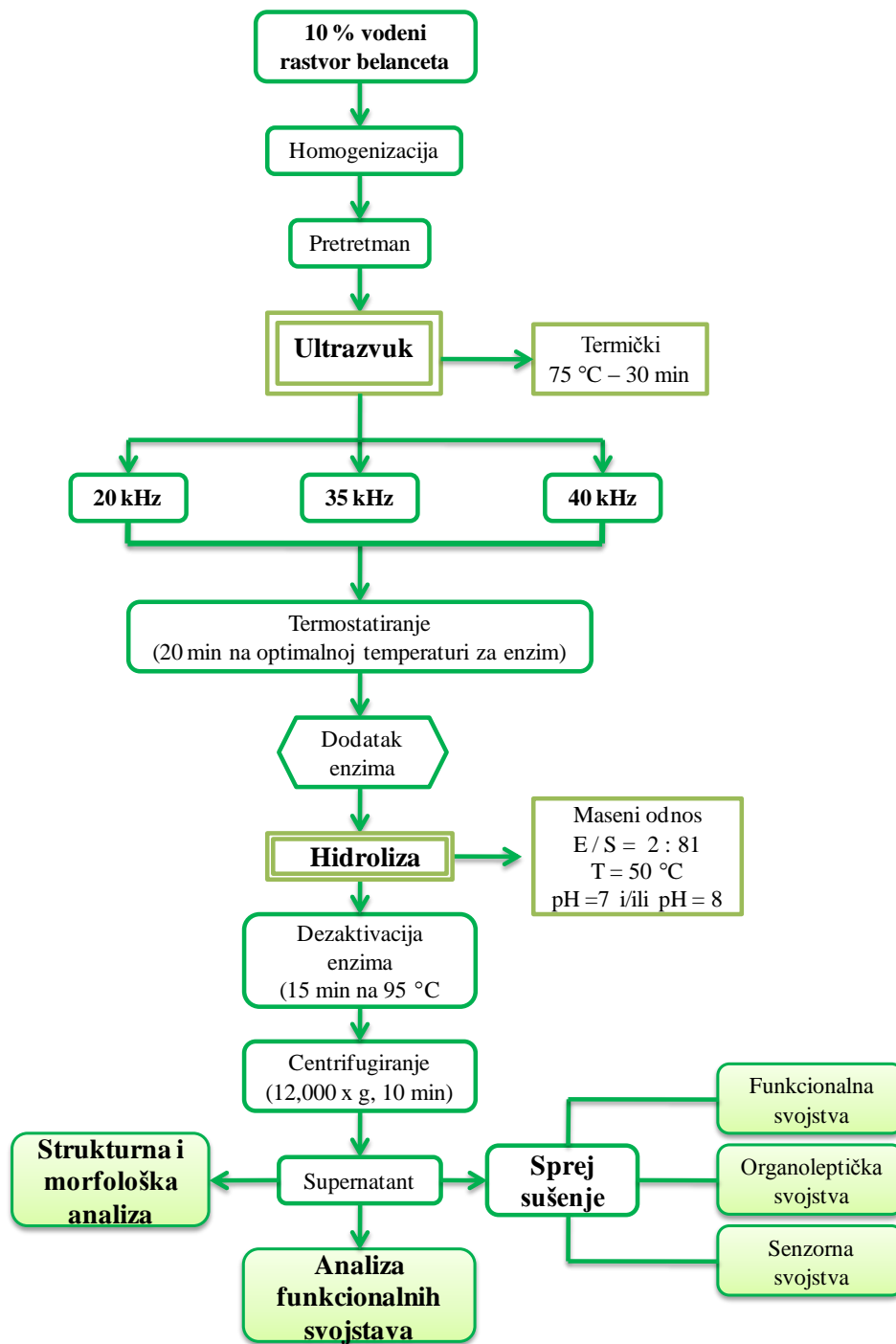
$$SH = \frac{h}{h_{\text{tot}}} = N_b \times B \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{m_p} \times \frac{1}{h_{\text{tot}}} \times 100 \quad (6.2)$$

gde su: h - broj ekvivalentnih peptidnih veza hidrolizovanih u trenutku t , h_{tot} - ukupan broj peptidnih veza u proteinskom supstratu u mmol/g proteina (7,67 mmol/g proteina belanceta), B - utrošak baze u ml, N_b - normalitet baze, α - prosečan stepen disocijacije NH_2 grupe ($1/\alpha=1,13$ na 50 °C i pH 8,0) i m_p - masa proteina u gramima.

Prosečna dužina peptidnih lanaca (PDPL) hidrolizata je određena pomoću jednačine:

$$PDPL = \frac{100}{SH (\%)} \quad (6.3)$$

uz pretpostavku da je ceo hidrolizat bio rastvorljiv i da je samo supernatant analiziran [2].



Slika 6.1. Procedura dobijanja hidrolizata proteina belanceta sa poboljšanim funkcionalnim svojstvima

6.3.7. Dvostepena enzimaska hidroliza proteina belanceta u šaržnom reaktoru sa mešanjem

Dvostepena enzimaska hidroliza proteina sve više se nameće u savremenoj literaturi kao najefikasnije tehnološko rešenje za dobijanje hidrolizata tačno definisanih svojstava. Izvedena je u šaržnom reaktoru zapremine 360 ml sa mešanjem (propelerska mešalica sa 4 propelera 200 obr/min) koristeći različite kombinacije proteolitičkih enzima. Ispitan je uticaj kombinacije komercijalnih proteolitičkih enzima Alakalaze (Alcalase[®] 2,4 L), Neutraze (Neutrase[®] 0,8 L) i Flevorzima (Flevourzyme[®] 500 L) na stepen hidrolize 10%-tnog vodenog rastvora supstrata, prethodno tretiranog termički na visokoj temperaturi (75 °C tokom 30 minuta) ili ultrazvučnim talasima (20 kHz, 35 kHz i 40 kHz). Hidroliza proteina belanceta je za svaki set eksperimenata (alkalaza + neutraza, alkalaza + flevorzim ili neutraza + alkalaza) vođena pri optimalnim uslovima za odabrani enzim.

10%-tni vodeni rastvor supstrata se prvo hidrolizuje alkalazom (pH 8, 50 °C, maseni odnos *E/S* 2:81, do stepena hidrolize od 18%, a zatim se pH rastvora podesi na 7, doda se neutraza ili flevorzim (*E/S* 2:81) i reakcija se izvodi na 50 °C u toku 60-80 min. Tokom reakcije hidrolize pH se održava konstantnim dodavanjem 1 M rastvora NaOH i stepen hidrolize se prati pH-stat metodom. Po završetku reakcije, enzim se deaktivira zagrevanjem na 90 °C 15 min.

Dvostepena enzimaska hidroliza sa neutrazom i alkalazom izvedena je tako što je 10% vodeni rastvor proteina belanceta prethodno tretiranog gore navedenim tretmanima prvo delimično hidrolizovao sa neutrazom (50 °C, pH 7), do stepena hidrolize od 18%. Dodatkom 2 M rastvora NaOH pH reakcije podešen je na 8 (optimalan za alkalazu), a zatim se dodala alkalaza (2,12 AU/g). Ostatak protokola je isti kao i prethodni. Svi eksperimentni su izvedeni u šaržnom reaktoru sa mehaničkim mešanjem i pri odgovarajućim reakcionim uslovima prikazanim u Tabeli 6.1.

Tabela 6.1. Reakcioni uslovi hidrolize za pripremu hidrolizata proteina belanceta

Enzim	Aktivnost enzima	Aktivnosti enzima u uzorcima (U)	Temperatura (°C)	pH	Tip
Alkalaza	$\geq 2,4$ U/g	2,12	50	8	endopeptidaza
Neutraza	$\geq 0,8$ U/g	0,76	50	7	endo
Papain	1,5-10 U/mg	5,00	50	8	endo i egzo
Fleovorzim	≥ 500 U/g	450	50	7	Kompleks endo i egzoproteaza

6.3.8. Kinetika hidrolize proteina belanceta u šaržnom reaktorskom sistemu

Prilikom ispitivanja odgovarajućeg empirijskog kinetičkog modela hidrolize proteina belanceta, svi eksperimenti hidrolize su izvođeni pri istim reakcionim uslovima u šaržnom reaktoru sa mehaničkim mešanjem koje je ostvareno upotrebom mešalice sa četiri propelera. Kako se kao najbolja pokazala jednostepena enzimska hidroliza katalizovana alkalazom, kinetika hidrolize ultrazvučno i termički pretretiranih proteina belanceta ispitana je pri optimalnim reakcionim uslovima za dejstvo alkalaze (50 °C, pH 8, 240 obr/min).

Početna kinetika reakcije hidrolize ispitana je pri različitim operativnim uslovima variranjem početne koncentracije enzima i početne koncentracije supstrata. Dobljene eksperimentalne krive su radi određivanja kinetičkih parametara fitovane kinetičkim modelom, koji uzima u obzir inhibiciju supstratom i dezaktivaciju enzima.

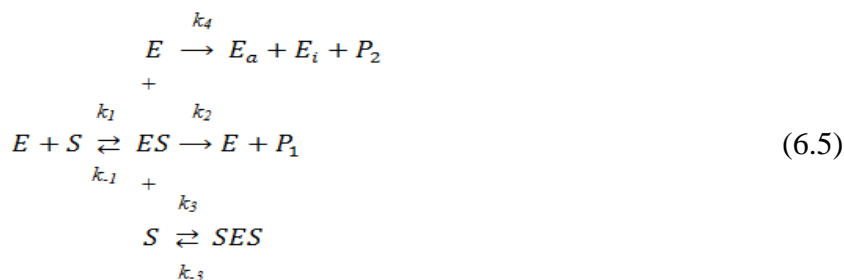
6.3.9. Izvođenje empirijskog kinetičkog modela

Empirijski kinetički model pretpostavlja da je reakcija hidrolize proteina belanceta nultog reda i uzima u obzir inhibiciju supstratom u višku, kao i smanjenje aktivne količine enzima (dezaktivacija) usled napada slobodnog enzima na enzim-supstrat kompleks u skladu sa reakcijom drugog reda. U skladu sa ovim pretpostavkama, eksperimentalno dobijene krive hidrolize proteina belanceta su fitovane sledećom empirijskom jednačinom:

$$\frac{dx}{dt} = a \cdot \exp(-bx) \quad (6.4)$$

u kojoj je: dx/dt brzina promene stepena hidrolize (konverzije), x stepen hidrolize (SH), a a i b kinetički parametri koje imaju različite vrednosti u zavisnosti od primenjenih eksperimentalnih uslova.

Reakcioni mehanizam enzimske hidrolize proteina belanceta može se predstaviti sledećim setom jednačina:



gde je: E slobodan enzim, S supstrat, ES i SES intermedijarni enzim-supstrat kompleksi, P_1 i P_2 krajnji proizvodi enzimske reakcije i k_1 , k_{-1} , k_2 , k_3 , k_{-3} , k_4 konstante brzine enzimske reakcije.

Kako je nepovratna reakcija ona koja kontroliše celi proces, brzina enzimske reakcije direktno zavisi od ovog stupnja reakcije i data je u obliku:

$$r = S_0 \frac{dx}{dt} = k_2[ES] \quad (6.6)$$

dok se brzina dezaktivacije enzima može predstaviti kinetikom drugog reda u skladu sa sledećom jednačinom:

$$-\frac{de}{dt} = k_4[E][ES] \quad (6.7)$$

Kombinacijom jednačina (6.6) i (6.7) dobija se izraz:

$$-\frac{dx}{de} = \frac{k_2}{k_4 S_0 [E]} \quad (6.8)$$

Kako je enzim u reakciji prisutan kao slobodan ili u formi kompleksa, ukupna koncentracija enzima jednaka je zbiru koncentracija slobodnog enzima i enzima vezanog za supstrat u formi enzim-supstrat kompleksa i data je sledećim izrazom:

$$e = [E] + [ES] + [SES] \quad (6.9)$$

Uzimajući u obzir pretpostavku o ravnotežnom stanju, izvedeni su izrazi za masene bilanse ES i SES kompleksa:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] + k_{-3}[SES] - (k_{-1} + k_2 + k_3)[S][ES] \approx 0 \quad (6.10)$$

$$\frac{d[SES]}{dt} = k_3[E][ES] + k_{-3}[SES] \approx 0 \quad (6.11)$$

Kombinacijom jednačina (6.10) i (6.11) dobijaju se izrazi za izračunavanje koncentracije ES i SES kompleksa:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad (6.12)$$

$$[SES] = \frac{[E][S]^2}{K_M K_I} \quad (6.13)$$

gde K_m predstavlja Mihaelis-Mentenovu konstantu, a K_I je konstanta inhibicije supstrata. Jednačine za izračunavanje vrednosti ovih konstanti su:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (6.14)$$

$$K_I = \frac{k_{-3}}{k_3} \quad (6.15)$$

Smenom jednačina (6.12) i (6.13) u jednačinu (6.9) dobija se izraz za izračunavanje koncentracije slobodnog enzima uz pretpostavku da je $[S] \approx S_0$:

$$[E] = \frac{K_M e}{K_M + S_0 + S_0^2/K_I} \quad (6.16)$$

Ako je inhibicija supstratom stupanj koji kontroliše brzinu enzimski katalizovane reakcije, tada je $K_M \leq S_0 + S_0^2/K_I$, pa se jednačina (6.16) može pojednostaviti izrazom:

$$[E] = \frac{K_M K_I e}{K_I S_0 + S_0^2} \quad (6.17)$$

a iz jednačine (6.12) tada sledi da je:

$$[ES] = \frac{K_I e}{K_I + S_0} \quad (6.18)$$

Smenom jednačine (6.17) u jednačinu (6.18) i integraljenjem u granicama x : 0 do x i e : e_0 do e dobija se krajnji izraz za ukupnu koncentraciju enzima:

$$e = e_0 \exp\left(-\frac{k_4 K_M K_I S_0}{k_2 (K_I S_0 + S_0^2)} x\right) \quad (6.19)$$

Iz jednačina (6.6), (6.18) i (6.19) izračunava se brzina enzimске reakcije po sledećoj formuli [340,341]:

$$r = k_2 \frac{K_I S_0}{K_I S_0 + S_0^2} e_0 \exp\left(-\frac{k_4 K_M K_I}{k_2 (K_I + S_0)} x\right) \quad (6.20)$$

a kinetički parametri su definisani kao:

$$a = \frac{k_2 K_I e_0}{K_I S_0 + S_0^2} \quad (6.21)$$

$$b = \frac{k_4 K_M K_I}{k_2 (K_I + S_0)} \quad (6.22)$$

Vrednosti kinetičkih parametara a i b iz empirijske jednačine $dx/dt = a \cdot \exp(-bx)$ usvojenog kinetičkog modela su izračunate metodom nelinearne regresije, dok su kinetičke konstante K_I , k_2 i k_d određene metodom linearne regresije.

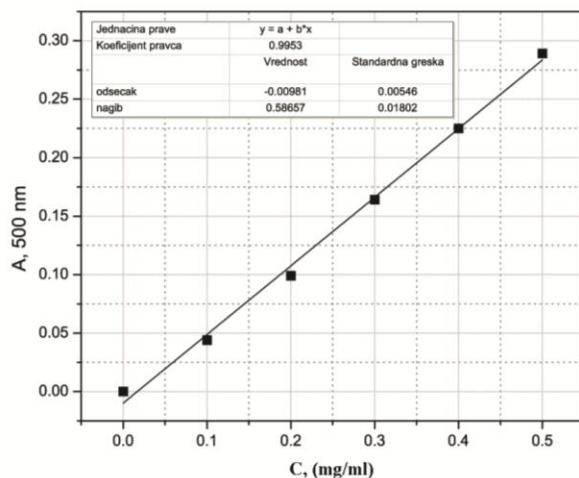
6.3.10. Određivanje sadržaja proteina Lorijevom metodom

Merenje koncentracije proteina u uzorcima zasniva se na spektrofotometrijskom merenju apsorbance dobijene u reakciji Lorijevog reagensa sa uzorkom. Reagens čine:

- 2% rastvor natrijum-karbonata u 0,1 M natrijum-hidroksidu (rastvor A),
- 1% rastvor bakar (II)-sulfata u destilovanoj vodi (rastvor B),
- 2% rastvor kalijum-natrijum tartarata u destilovanoj vodi (rastvor C) i
- Folinov reagens (rastvor F).

Reagens D se priprema pravljjenjem smeše koju čine 1 ml rastvora B, 1 ml rastvora C koji se u normalnom sudu dopune do 100 ml rastvorom A. U 500 μ l hidrolizata doda se 500 μ l vode i 2 ml reagensa D, vorteksira i nakon 10 minuta doda 200 μ l razblaženog Folinovog reagensa (razblažen vodom u odnosu 1:3). Smeša se ponovo vorteksira i posle 45 min meri se apsorbance na 500 nm. Slepnu probu čine 1 ml uzorka i 2 ml reagensa koja se vorteksira i nakon 10 minuta joj se doda 200 μ l rastvora F. Do reakcije dolazi između peptidnih veza i jona bakra koji se u alkalnim uslovima redukuju. Nakon toga dolazi do redukcije Folinovim reagensom pomoću novonastalog kompleksa jona bakra i peptida. Usled ove reakcije dolazi do promene boje rastvora u plavo. Intenzitet boje zavisi od koncentracije proteina, a određuje se merenjem apsorbance na 500 nm.

Koncentracije proteina u uzorcima su preračunate na osnovu konstruisane standardne prave dobijene merenjem apsorbanci standardnog rastvora albumina u opsegu koncentracija od 0,1 do 0,5 mg/ml.



Slika 6.2. Standardna prava za određivanje koncentracije proteina

6.3.11. Metode za određivanje tehnološko-funkcionalnih svojstava

6.3.11.1. Određivanje rastvorljivosti

Rastvorljivost proteina određena je uzorkovanjem 200 μ l uzorka koji su naknadno razblaženi destilovanom vodom do ukupne zapremine od 15 ml. Analize su izvedene u menzuri od 25 ml i svaki uzorak je bio pripremljen u triplikatu. Direktno u menzuri vršilo se podešavanje pH vrednosti na 2, 4, 6, 8, 10 i 12 pomoću 0,5 M rastvora HCl ili 0,5 M rastvora NaOH. Posle podešavanja odgovarajuće pH vrednosti, svaki uzorak je dopunjen destilovanom vodom kako bi se postigla ukupna zapremina od 20 ml. Uzorci su, zatim, centrifugirani 10 minuta na 12,300 ob/min. Metodom po Loriju određen je saržaj ukupnih (necentrifugirani) i rastvorljivih proteina u uzorku (supernatant), a rastvorljivost je preračunata iz odnosa rastvorljivih i ukupnih proteina i izražena je u procentima.

6.3.11.2. Određivanje kapaciteta penjenja i stabilnosti pene

Kako bi se ispitala sposobnost penjenja proteina belanceta bilo je neophodno ispitati dve osnovne veličine kojima se opisuje ovo svojstvo proteina, a to su kapacitet pene (KP) i stabilnost pene (SP).

10%-tni vodeni rastvori belanceta i hidrolizati razblaže se destilovanom vodom tako da krajnja procentna koncentracija bude 8%. 50 ml ovako razblaženih uzoraka se sipa u plastični cilindar zapremine 700 ml i prečnika 7,2 cm i meša 4 min sa laboratorijskim homogenizatorom (Yellowline, DI 25 basic, Ica Works Inc., Wilmington, 600 W, 50 V,

8,000–24,000 rpm) na sobnoj temperaturi i 9,500 ob/min. Nakon isteka vremena propeler homogenizatora se uklanja, a cilindar sa uzorkom se pokriva parafilmom kako bi se sprečilo narušavanje pene. Na osnovu zapremine formirane pene računa se kapacitet pene prema sledećoj jednačini:

$$KP(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad (6.23)$$

gde je: A zapremina pene nakon 4 min (ml), a B zapremina pene u trenutku $t=0$ (početna zapremina) (ml).

Stabilnost pene je definisana kao procenat tečnosti prisutne u peni nakon 30 min stajanja na sobnoj temperaturi u poređenju sa procentom tečnosti prisutne u peni nakon 4 min mešanja. Izračunava se prema sledećoj jednačini:

$$KP(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad (6.24)$$

gde je: A zapremina pene nakon 30 min stajanja na sobnoj temperaturi (ml), a B zapremina pene u trenutku $t=0$ (početna zapremina) (ml).

6.3.11.3. Određivanje emulgujućih svojstava

Mutnoća emulzije se određuje merenjem apsorbance emulzije na spektrofotometru i na osnovu nje se izračunava vrednost mutnoće uzoraka. Emulzija se priprema mešanjem 3% suspenzije uzorka sa suncokretovim uljem u zapreminskom odnosu 1:2. Ovako spremljena emulzija se meša pomoću homogenizatora (Yellowline, DI 25 basic, Ica Works Inc., Wilmington, 600 W, 50 V, 8,000–24,000 rpm) 90 s na 8000 ob/min i 25 °C. Nakon mešanja odmah se meri apsorbance na 500 nm u UV/Vis spektrofotometru (Amersham Bioscience, Ultrospec 3300 pro) sa kivetom debljine 1 cm. Mutnoća se računa kao:

$$T = 2,303 \cdot \frac{A}{l} \quad (6.25)$$

gde je: T mutnoća, A apsorbance na 500 nm, l debljina kivete (m).

Indeks aktivnosti emulzije (IAE) se zatim računa prema sledećoj formuli:

$$IAE \left(m^2/g \right) = 2 \cdot T \frac{r}{c \cdot \theta} \quad (6.26)$$

gde je: T mutnoća (izračunata iz prethodnog izraza), θ zapremina uljane faze (ml), c je masa proteina u jedinici zapremine vodene faze pre pripreme emulzije (g), r je faktor razblaženja.

Stabilnost emulzije određena je nakon 24 h. Pripremljena emulzija stajala je u frižideru na 4 °C. Nakon 24 h ponovo je izmerena apsorbancija na 500 nm i mutnoća se računala po gore navedenom izrazu.

Indeks stabilnosti emulzije (ISE) računa se na sledeći način:

$$ISE(h) = \frac{T \cdot \Delta t}{\Delta T} \quad (6.27)$$

gde je: T mutnoća određena na početku (0 h), ΔT je promena mutnoće tokom 24 h i Δt je vremenski interval stajanja emulzije (24 h).

6.3.11.4. Određivanje svarljivosti (digestibilnost)

Određivanje digestibilnosti rađeno je po metodi Elkalila (Elkhalil) i sar. sa malim izmenama [342]. 2 ml 10%-tnog vodenog rastvora belanceta ili hidrolizata se rastvori u 10 ml rastvora tripsina (0,2 mg/ml u 10 mM Tris-HCl puferu, pH 7,6). Suspenzija se inkubira 2 h na 37 °C, a potom se reakcija hidrolize tripsinom zaustavlja dodavanjem 5 ml 50%-nog rastvora trihlorsirćetne kiseline (TCA). Posle zaustavljanja reakcije suspenzija se hladi na 4 °C 30-35 minuta nakon čega se centrifugira na 10,000 ob/min tokom 25 minuta (SIGMA 2-16, rotor 12141, Nemačka). Talog nakon centrifugiranja se resuspenduje u 5 ml 0,2 M rastvora NaOH, a koncentracija proteina se određuje metodom po Loriju. Svarljivost se računa po formuli:

$$digestibilnost(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad (6.28)$$

gde je: A ukupni sadržaj proteina u uzorku pre reakcije (mg), a B sadržaj proteina u talogu (mg).

6.3.11.5. Određivanje redukujuće moći

Redukujuća moć određena je po modifikovanoj metodi Ojaza (Oyaiz) i sar. [343]. Alikvot od 0,5 ml uzorka se pomeša sa 2,5 ml 0,2 M rastvora natrijum-fosfatnog pufera pH 6,6 i ovoj smeši se doda 2,5 ml 1% kalijum-heksacijanoferat (III). Ovako pripremljena smeša se inkubira 20 min na 50 °C. Nakon završene inkubacije, smeša se ohladi na sobnoj

temperaturi, zatim se doda 2,5 ml 10%-tnog rastvora trihlorsirćetne kiseline i centrifugira 10 min na 3000 ob/min. 2,5 ml supernatanta se dekantuje i pomeša sa 2,5 ml destilovane vode i sa 2,5 ml 0,1%-tnog rastvora gvožđe(III)-hlorida posle čega se meri apsorbanca na 700 nm. Povećanje apsorbanca uzorka ukazuje na njegovu veću moć redukcije.

6.3.12. SDS-PAGE elektroforeza

U cilju određivanja proteinskog sastava uzoraka vršeno je razdvajanje proteina primenom metode vertikalne SDS-PAGE gel-elektroforeze. Kako bi se molekuli proteina na osnovu molekulske mase bolje razvojili, razdvajajući gel je pripremljen u gradijentu 10-20% poliakrilamida i gel za nalivanje u koncentraciji 4%. Nakon elektroforetskog razdvajanja, gel je obojen bojom bromfenol plavo R-250, a molekulska masa svake trake na gelu određena je poređenjem sa markerima molekulske mase u opsegu 14,4-116 kDa (Thermo scientific, Lithuania). Molekulski markeri sadrže protein: β -galaktozidaza (116 kDa), goveđi serum albumin (66,2 kDa), ovalbumin (45,0 kDa), laktat-dehidrogenaza (35,0 kDa), REase Bsp98I (25,0 kDa), β -laktoglobulin (18,4 kDa), lizozim (14,4 kDa).

Priprema za izvođenje ove metode se sastojala iz nekoliko faza:

1. Priprema rastvora za pravljenje gelova

Tabela 6.2. Receptura za pripremu rastvora za pravljenje gelova

	Rastvori za gelove			
	Tris (1,5M) pH 8,8*	Tris (0,5M) pH 6,8*	Akrilamid, 30%	APS, 10%
Tris	36,3 g	3,0 g	/	/
Akrilamid	/	/	60,0 g	/
Bis-Akrilamid	/	/	1,6 g	/
APS**	/	/	/	1,0 g
dest. H ₂ O	do 200 ml	do 50 ml	do 200 ml	do 10 ml

* pH podešavan sa konc. HCl; **amonijum-persulfat

2. Priprema pufera

Tabela 6.3. Receptura za pripremu rastvora za pravljenje pufera

	Pufer	
	Pufer za elektroforezu pH 8,3	Pufer za uzorke
Tris	3,0 g	/
Glicin	14,4 g	/
10,0% SDS	10,0 ml	4 ml
Tris (0,5M) pH 6,8	/	2,5 ml
Glicerol	/	2,0 ml
β -Merkaptoetanol	/	1,0 ml
1%-tni rastvor bromfenol plavo	/	0,1 ml
dest. H ₂ O	do 1000 ml	do 9 ml

3. Priprema rastvora za bojenje i obezbojavanje gelova

Tabela 6.4. Receptura za pripremu rastvora za bojenje i obezbojavanje

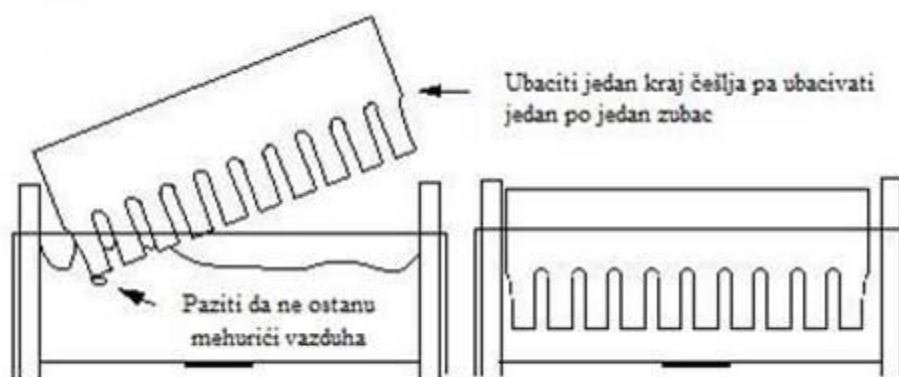
	Rastvor	
	Rastvor za bojenje	Rastvor za obezbojavanje
Metanol (40,0%)	125,0 ml	100,0 ml
Glacijalna sirćetna kiselina	25,0 ml	100,0 ml
Bromfenol plavo R-250	0,25 g	/
dest. H ₂ O	do 100 ml	do 1000 ml

Nakon pripreme rastvora vršeno je pravljenje gelova koji će se nalivati u sistem za elektroforezu. Gelovi su pripremani prema recepturama prikazanim u Tabeli 6.5:

Tabela 6.5. Recepture za pripremu gelova

	Gel		
	Gel za razdvajanje (10,0%)	Gel za razdvajanje (20,0%)	Gel za koncentrisanje (4,0%)
dest. H ₂ O	6,0 ml	/	6,0 ml
Akrilamid (30,0%)	4,95 ml	9,9 ml	1,33 ml
Tris-pufer (1,5M)	3,75 ml	3,75 ml	/
Tris-pufer (0,5M)	/	/	2,50 ml
SDS (10,0%)	0,15 ml	0,15 ml	0,10 ml
APS (10,0%)	0,10 ml	0,03 ml	0,05 ml
TEMED	0,005 ml	0,005 ml	0,005 ml
saharoza	/	2,25 gm	/

Po završetku pripreme svih potrebnih rastvora, gel za razdvajanje se prvi nalivao u sistem za elektroforezu. Nakon nalivanja, gel je ostavljan oko 1 h da bi se izvršila polimerizacija. Po završetku polimerizacije, u sistem je naliven gel za koncentrisanje i ubačen je češalj čija je funkcija da napravi prostor za nanošenje uzoraka (Slika 6.3). Ovaj gel je, takođe, ostavljen oko 1 h da polimerizuje.



Slika 6.3. Princip stavljanja češlja u sistem za elektroforezu

Nakon nanošenja gelova, vršena je priprema uzorka koja je podrazumevala mešanje uzorka sa puferom za uzorke u odnosu 1:1 i zagrevanje u ključalom vodenom kupatilu 2 min. Ovako pripremljen uzorak (10-30 μ l) je sipan u prostor predviđen za nanošenje uzoraka u gelu za koncentrisanje. Sistem je zatim napunjen puferom za elektroforezu i priključen na izvor struje. Parametri struje su podešavani na vrednosti 12 mA i 100W. Proces razdvajanja proteina na gelu je prekidano kada se vidljivi trag boje nalazio na 1,5 cm

od kraja gela. Po završetku procesa razdvajanja, gel je potapan u rastvor za bojenje i ostavljen oko 2-3 h da se boji. Pošto je gel obojen, vršeno je njegovo ispiranje radi uklanjanja viška boje (rastvor za obezbojavanje), a u cilju uočavanja proteinskih traka. Obezbojavanje je vršeno tokom 24 h uz menjanje rastvora na svakih 3-4 h. Ovako dobijene obojene proteinske trake slikane su kamerom visoke rezolucije, a molekulska masa svake trake na gelu određena je poređenjem sa markerima molekulske mase u opsegu 14,4-116 kDa.

6.3.13. Merenje raspodele veličine čestica

Za određivanje srednje vrednosti veličine čestica i prisustva/odsustva većih čestica u analiziranim uzorcima (različito pretretirani proteini belanceta i hidrolizati), primenjena je tehnika statičkog rasipanja svetlosti, poznata kao laserska difrakcija. Merenja su izvedena na uređaju Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Velika Britanija) koji je povezan sa softverskim paketom Mastersizer 2000 6.12. Merenje srednje veličine čestica zasniva se na prolasku fokusiranog snopa svetlosti i rasejavanju svetlosti pod uglom od 173° . Zetasizer Nano ZS sadrži He-Ne crveni izvor svetlosti talasne dužine 633 nm koji je smešten u osi instrumenta (prečnik zraka 0,63 mm, divergencija 1,5 mrad, a maksimalna optička snaga je 4 mW). Svetlost koju čestice rasipaju sabira se pomoću Furieovog sočiva, a podaci o intenzitetu rasute svetlosti se šalju do detektora i koriste za računanje veličina čestica. Sva merenja su izvršena neposredno nakon ultrazvučnog ili termičkog pretretmana dok su sve čestice još uvek bile dispergovane u sistemu.

6.3.14. Metode za određivanje površinskih karakteristika

6.3.14.1. Merenje naelektrisanja čestica (zeta potencijal, Z_0)

Zeta potencijal je određen primenom tehnike elektroforetske pokretljivosti, kojom se meri kretanje čestica u primenjenom električnom polju. Merenja su izvedena na uređaju Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Velika Britanija) koji je povezan sa softverskim paketom Zetasizer (Verzija softvera 6.12, Malvern Instruments). Posедуje automatsku jedinicu za titraciju (MPT-2) sa univerzalnom ćelijom u koju se smešta kiveta sa uzorkom za analizu. Jedinica za titraciju u kojoj se nalazi ćelija sa uzorkom je povezana preko kapilarnog sistema i peristaltičke pumpe sa kapilarnom ćelijom. U toku merenja uređaj je

isključen iz PCS moda i prebačen u Laser Doppler Anemometry (LDA) mod. Jačina primenjenog polja u toku merenja iznosila je 20 V/cm. S obzirom da je zeta potencijal funkcija naelektrisanja na površini čestica i vrste i jonske jačine elektrolita prisutnih u disperzionom medijumu, merenje zeta potencijala za sve ispitivane uzorke izvedeno je u destilovanoj vodi (originalni disperzioni medijum). Da bi se izbegle fluktuacije u zeta potencijalu ispitivanih uzoraka, usled varijacija u električnoj provodljivosti destilovane vode, koja može da bude u intervalu od 1 do 10 $\mu\text{S/cm}$, električna provodljivost destilovane vode kojom su razblaženi ispitivani uzorci pre merenja podešena je na 50 $\mu\text{S/cm}$ uz korišćenje 0,9%-tnog (m/v) rastvora natrijum-hlorida. pH vrednost ispitivanih uzoraka u toku merenja bila je u intervalu od 7,8 do 8. Pre automatske titracije, svi uzorci su filtrirani kroz filter sa veličinom pora 0,45 μm . Svaki uzorak je analiziran tri puta, a broj ranova po jednom merenju je bio 30.

Zeta potencijal određen je prema jednačini [344]:

$$\xi = \frac{\mu \cdot \eta}{\varepsilon} \quad (6.29)$$

gde je: ξ zeta potencijal, μ je pokretljivost, η je viskoznost rastvora, a ε je dielektrična konstanta rastvarača. Rezultati ovih ispitivanja su upotrebljeni za određivanje površinskog naelektrisanja čestica i dobijanje informacija o fizičkoj stabilnosti ispitivanih uzoraka.

6.3.14.2. Merenje površinske hidrofobnosti (H_0)

Površinska hidrofobnost (H_0) ultrazvučno i termički pretretiranih vodenih rastvora proteina belanceta i njihovih hidrolizata određena je pomoću fluorescentne spektroskopije prema metodi Mua (Mu) i sar. (2010) sa malim izmenama [345]. Ispitivanje površinske hidrofobnosti proteina, praćeno je vezivanjem hidrofobne fluorescentne boje, 8-anilino-1-naftalensulfonske kiseline (ANS) za već postojeće hidrofobne (nepolarne) regione na površini molekula proteina putem nepolarne anilin-naftalenske grupe. Vezivanje ANS za hidrofobne delove molekula proteina praćeno je povećanjem indeksa fluoriscencije (IF) molekula.

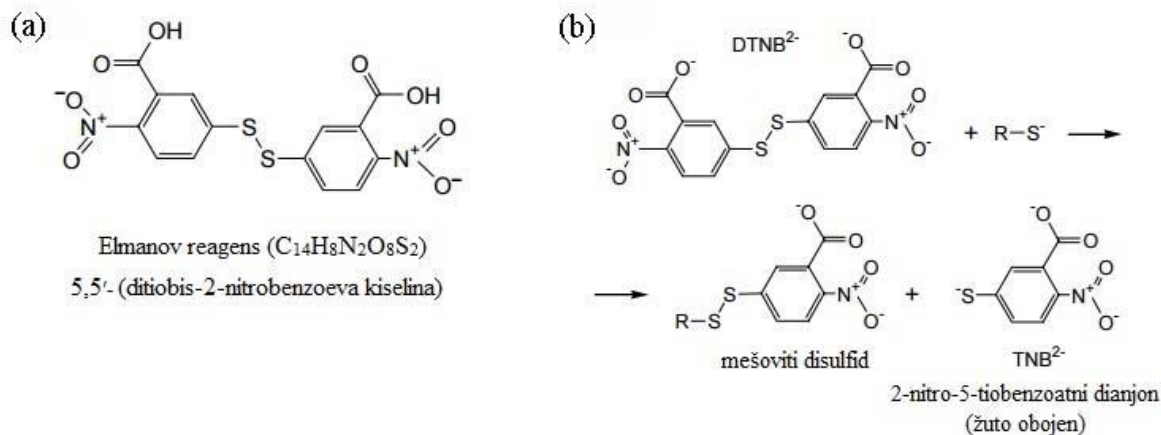
U metodi je korišćen 8 mM ANS pripremljen neposredno pred upotrebu u fosfatnom puferu pH 7. Pre merenja uzorci su razblaženi sa 0,1 M fosfatnim puferom pH 7 u opsegu koncentracija od 0,0025 - 0,5 w/v. Nakon toga, u 1,393 ml razblažnih uzoraka, sipano je 7 μL ANS direktno u kvarcnu kivetu i meren je indeks fluoriscencije (IF) za svaki uzorak

ponaosob. IF je meren na 25 °C na spektrofluorimetru (Horiba FluoroMax-4, HORIBA, Jobin Yvon) sa konstantnim eksitacionim i emisionim prorezom (*na engl.* excitation and emission slit) od 2,5 nm i brzinom skeniranja od 10 nm/s. Talasna dužina na kojoj je vršena ekscitacija molekula je iznosila 365 nm, dok su merenja emisije izvedena na talasnoj dužini od 480 nm.

Visoka osetljivost ove metode potiče upravo od razlike u talasnim dužinama između ekscitujućeg i emitujućeg zračenja, tako da se dobija signal naspram suštinski nulte pozadine. Površinska hidrofobnost (H_o) je izražena kao nagib prave dobijene konstruisanjem dijagrama IF u funkciji koncentracije proteina.

6.3.14.3. Određivanje sadržaja sulfhidrilnih (SH) grupa

Sadržaj sulfhidrilnih grupa ultrazvučno i termički pretretiranih vodenih rastvora proteina belanceta i njihovih hidrolizata određen je spektrofotometrijski pomoću 5,5'-(ditiobis - 2 - nitrobenzojeve kiseline), DTNB, koja reaguje sa slobodnim sulfhidrilnim grupama u molekulu proteina obrazujući dianjon (TNB^{2-}) čiji se apsorpcioni maksimum meri na 412 nm (Slika 6.4). Analiza je izvedena prema Elmanovoj proceduri sa malim izmenama [346].



Slika 6.4. Struktura (a) i redukcija Elmanovog reagensa (b) [347]

Reaktivne (površinske) sulfhidrilne grupe su merene na sledeći način. Uzorci su razblaženi standardnim puferom (pH 8) koji se sastojao od 86 mM TRIS-a, 90 mM glicina i 4 mM EDTA tako da je krajnja koncentracija bila 0,05%. Nakon razblaženja uzorci su centrifugirani 20 min na 7889×g kako bi se uklonili nerastvorni proteini. 2,5 ml

supernatanta je dekantovano i resuspendovano sa 0,025 ml Elmanovog reagensa (DTNB) koncentracije 4 mg/ml. Smeša je ostavljena da stoji 15 min na sobnoj temperaturi nakon čega je merena apsorbancija na 412 nm.

Sadržaj ukupnih sulfhidrilnih grupa određen je na isti način kao i sadržaj reaktivnih sulfhidrilnih grupa, samo je umesto standardnog pufera korišćen denaturišući pufer koji se sastojao od 86 mM TRIS-a, 8 M rastvora uree i 0,5% (w/v) natrijum-dodecil-sulfata.

Merenja su izvršena u odnosu na slepu probu koja je spremljena po istoj proceduri, samo su se umesto uzorka sipali standardni (reaktivne grupe) i denaturišući (ukupne grupe) pufer. Denaturansi (urea, natrijum-dodecil-sulfat) su se koristili kako bi povećali reaktivnost sporo reagujućih SH grupa u molekulima proteina.

Sadržaj reaktivnih i ukupnih SH grupa izračunat je prema sledećoj jednačini:

$$SH \left(\frac{\mu\text{mol}}{g} \right) = 73,53 \cdot A_{412\text{nm}} \cdot \left(\frac{D}{C} \right) \quad (6.30)$$

gde je: *SH* sadržaj sulfhidrilnih grupa, $A_{412\text{nm}}$ izmerena apsorbancija uzoraka na 412 nm, *C* koncentracija proteina u uzorku u mg/ml i *D* je faktor razblaženja.

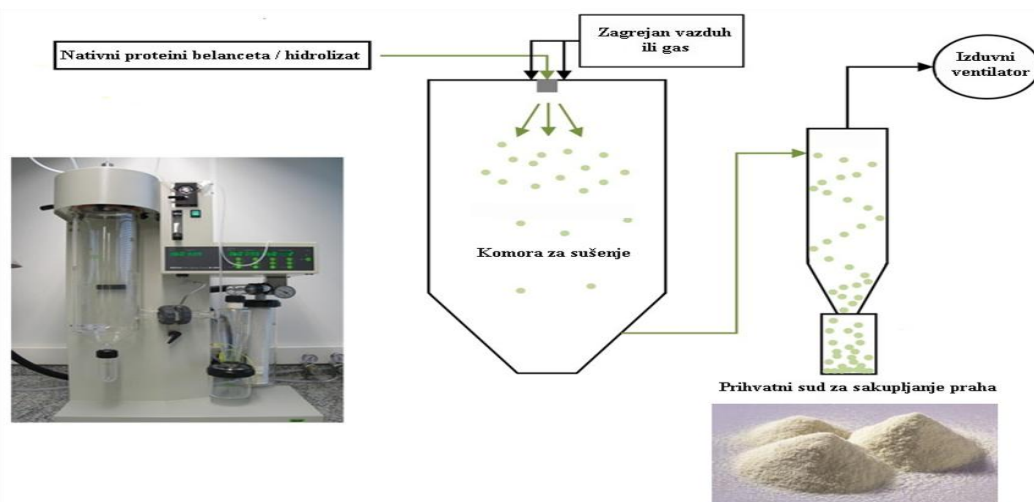
6.3.15. Sušenje raspršivanjem (sprej sušenje) i sušenje zamrzavanjem (liofilizacija)

U cilju dobijanja praškastih proizvoda svi uzorci proteina belanceta su osušeni tehnikom sprej sušenja u sprej drajeru (Büchi Dryer B-290, Büchi, Švajcarska) i tehnikom liofilizacije u liofilizatoru (Alpha 1-4 LSC plus, CHRIST). Ispitan je uticaj sprej sušenja na funkcionalna svojstva osušenih (praškastih) uzoraka. Tokom optimizacije procesa sušenja hidrolizata proteina belanceta, pripremljenih pri usvojenim procesnim parametrima ultrazvučnog i termičkog pretretmana i hidrolize, ispitan je uticaj ulazne (110-180 °C) i izlazne temperature (70-100 °C) na željene karakteristike finalnog proizvoda.

Napojna smeša se pomoću kompresora uvodi u uređaj za raspršivanje pri ulaznoj temperaturi od 110-180 °C, pri čemu se formiraju kapljice koje se izlažu toploj struji vazduha, a suve čestice nastaju isparavanjem tečnosti sa kapljica (Slika 6.5). Završna faza podrazumeva odvajanje (separaciju) suvog praha iz struje vazduha, nakon čega se vrši sakupljanje praha u izlaznoj komori (prihvatni sud).

Dobijeni prašeni uzorci su čuvani u petri šoljama u eksikatoru na sobnoj temperaturi i korišćeni su za ispitivanje strukturnih i morfoloških karaktetika. Za potrebe merenja

koordinata boje, od dobijenih prahova su napravljene tablete tabletiranjem na presi. 2 mg praškastog uzorka je nanešeno na presu i dobijene su tablete prečnika 1 cm i debljine oko 1 mm.



Slika 6.5. Šematski prikaz sprej drajera korišćenog u ovom radu

Sušenje liofilizacijom izvedeno je tako što su uzorci pre sušenja zamrznuti na -30°C u trajanju od 24 h (zamrznuti u staklenim Petrijevim kutijama u sloju debljine ~ 1 cm). Samo sušenje je vršeno pod sledećim uslovima : glavno sušenje 12 h na -30°C pri 0,25 mbar; finalno sušenje 5 h na 35°C pri 0,25 mbar. Svi uzorci su nakon sušenja smešteni u zatvorene sudove i čuvani na $\sim 4^{\circ}\text{C}$.

6.3.16. Metode za određivanje funkcionalnih, senzornih i organoleptičkih svojstava prahova

6.3.16.1. Određivanje disperzionog vremena

Prašasti uzorci proteina belanceta prethodno osušeni tehnikom raspršivanja rastvoreni su u destilovanoj vodi tako da im je krajnja koncentracija bila 30 mg/ml. Nakon dodavanja odgovarajuće količine vode, uzorci su mešani staklenim štapićem i štopericom je mereno vreme neophodno za potpuno rastvaranje praha. Izmereno vreme označeno je kao disperziono vreme.

6.3.16.2. Određivanje kapaciteta vezivanja vode i ulja

Kapacitet vezivanja vode (KVV) određen je rastvaranjem spraćenog uzorka u destilovanoj vodi do krajnje koncentracije od 0,25 g/ml. Pre dodatka smeše, izmerena je masa praznih kiveta, a smeša je ostavljena da stoji 30 minuta na sobnoj temperaturi uz naizmenično mešanje. Nakon mešanje, smeša je centrifugirana korišćenjem centrifuge velike brzine (SIGMA 2-16, rotor 12141, Nemačka) u vremenu od 30 minuta pri $1,200 \times g$. Supernatant je dekantovan i izmerena je masa kivete sa talogom. Kapacitet vezivanja vode izračunat je pomoću formule:

$$\text{KVV}(\%) = \frac{A - B}{C} \times 100 \quad (6.31)$$

gde je: A masa kivete sa talogom (g), B masa prazne kivete (g) i C masa uzorka (g).

Kapacitet vezivanja ulja (KVU) određen ja na isti način, samo su uzorci bili rastvoreni u suncekretovom ulju (koncentracija 0,1 g/ml), umesto u destilovanoj vodi.

6.3.16.3. Određivanje senzornih svojstava

U okviru ove disertacije, ispitana je gorčina ultrazvučno i termički pretretiranih i naknadno hidrolizovanih proteina belanceta koji su osušeni tehnikom raspršivanja pri usvojenim procesnim parametrima. Na osnovu senzorne evaluacije šest individua ocenjena je gorčina hidrolizata. Rezultati su izraženi u jedinicama koncentracije rastvora kofeina iste gorčine. Kofein je pripremljen u opsegu koncentracija 2-8 mg/ml.

6.3.16.4. Merenje koordinata boje prahova hidrolizata proteina belanceta

Instrumentalno određivanje boje ostvareno je primenom tristimulusne kolorimetrije. Ova metoda zasniva se na trikomponentnoj teoriji vizuelne percepcije boje, odnosno na činjenici da ljudsko oko ima receptore za tri osnovne boje (crvena, zelena i plava) i da sve ostale boje vidi kao kombinaciju ove tri osnovne boje [348]. Koordinate boje osušanih i tabletiranih uzoraka (CIE, L^* , a^* , b^*) su određene pomoću Datacolor SF300 UV refleksionog spektrofotometra (Slika 6.6), koristeći izvor svetlosti D65 pri standardnom uglu posmatranja od 10° . Pomoću CIE koordinata određena je razlika u obojenju (ΔE^*) prema sledećoj jednačini:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2} \quad (6.32)$$

gde je: ΔL^* - razlika u svetlini boje između merenog i referentnog uzorka; Δa^* - razlika u vrednosti koordinate boje crveno/zeleno između merenog i referentnog uzorka i Δb^* - razlika u vrednosti koordinate boje žuto/plavo između merenog i referentnog uzorka. Referentni uzorak na osnovu koga je izvršeno poređenje ispitivanih uzoraka i određena razlika u obojenju među uzorcima bio je tabletirani hidrolizat pripremljen enzimskom hidrolizom ultrazvučno pretretiranog belanceta (UZS-20kHz).

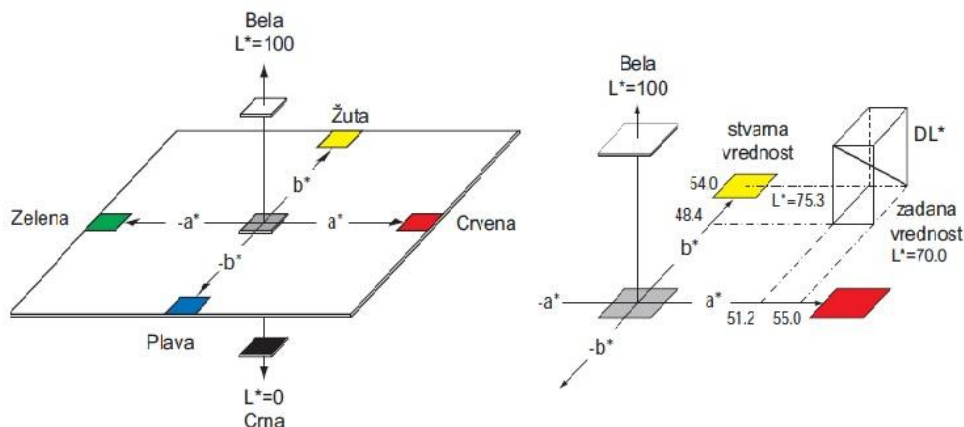


Slika 6.6. Datacolor SF300 UV refleksioni spektrofotometar

Parametri boje iskazani su u CIE $L^*a^*b^*$ sistemu (CIE, 1976) koji je zasnovan na tri koordinate preko kojih se definiše boja uzorka: L^* (svetlina boje), a^* (udeo crvene boje ($+a^*$) ili zelene boje ($-a^*$)) i b^* (udeo žute boje ($+b^*$) ili plave boje ($-b^*$)) [12]. U cilju preciznijeg definisanja boje predlaže se da se pored standardnih vrednosti koje su definisane u CIE $L^*a^*b^*$ sistemu, određuje i nijansa boje (h), kao i zasićenost boje (C^*) ispitanog uzorka, jer su to parametri koje intuitivno razumeju svi od proizvođača do potrošača [349, 350]. Nijansa boje je svojstvo boje koje odgovara varijantama u talasnoj dužini (crvena, žuta, plava, zelena itd.) (SRPS EN ISO 5492, 2012) i ona se izražava u stepenima i određuje iz vrednosti koordinata a^* i b^* jednačinom [351]:

$$h = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (6.33)$$

U suštini, nijansa boje (h) određuje vrednost ugla pod kojim se nalazi odgovarajuća boja (tačke A, B, C) računajući u odnosu na $+a^*$ osu koordinativnog sistema (Slika 6.7).



Slika 6.7. Predstavljanje razlike boja u CIE L* a* b* sistemu boja [352]

Zasićenost boje (C^*) je merilo stepena čistoće boje. U centru koordinativnog sistema je 0 i povećava se sa udaljenošću boje od centra, kao što je prikazano na Slici 6.7. Boje locirane blizu centralne ose obojenog prostora imaju malu (nisku) zasićenost, što znači da su to mutne ahromatične boje, sa dosta sive, dok su boje locirane blizu periferije obojenog prostora življe. Zasićenost boje se takođe može izračunati na osnovu poznatih vrednosti za parameter a^* i b^* pomoću izraza:

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (6.34)$$

6.3.16.5. Merenje naelektrisanja prahova (zeta potencijal)

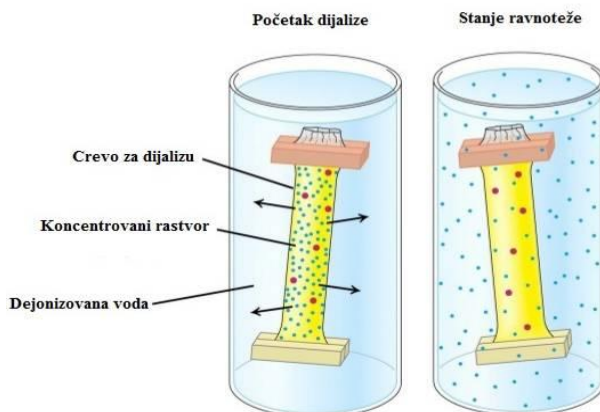
Zeta potencijal je određen po prethodno opisanoj metodi 6.3.14.1. Praškasti uzorci su pripremljeni rastvaranjem u vodi do finalne koncentracije od 10 mg/ml.

6.3.16.6. Određivanje hemijskog sastava

Sadržaj proteina, vlage, pepela i lipida osušenih hidrolizata određen je korišćenjem standardnih AOAC metoda [353].

6.3.17. Uklanjanje soli (odsoljavanje) procesom dijalize

Usled dodavanja NaOH tokom reakcije hidrolize (radi održavanja konstantne pH vrednosti) dolazi do reakcije neutralizacije i formiranja soli koje imaju neželjeno dejstvo na ukus naknadno osušenih prahova. Jedan od najjednostavnijih načina uklanjanja soli iz hidrolizata proteina belanceta jeste dijaliza (Slika 6.8).



Slika 6.8. Šematski prikaz procesa dijalize

U tu svrhu, korišćena su celulozna creva za dijalizu. Hidrolizati dobijeni iz ultrazvučno i termički pretretiranih proteina belanceta se sipaju u crevo za dijalizu (MWCO 12 kDa) koje se ponaša kao semipermeabilna membrane kroz koju prolaze molekuli manji od veličine pora, kao što su soli. Crevo se sa donje strane osigura plastičnom štipaljkom i puni se uzorkom, a zatim zatvara i sa druge strane. Veoma je važno onemogućiti curenje uzorka iz creva. Crevo za dijalizu zajedno sa uzorkom se inkubira 1 h u dejonizovanoj vodi na 4 °C u cilju postizanja koncentracione ravnoteže (molekuli soli se kreću iz sredine sa većom u sredinu sa manjom koncentracijom). Nakon 20 minuta dejonizovana voda se zameni svežom dejonizovanom vodom, creva sa uzorkom se potapaju u čašu sa vodom i ostavljaju 24 sata pri čemu se voda menja na svakih 6 sati. Po završetku dijalize, uzorci su osušeni i određena im je gorčina.

6.3.18. Strukturna i morfološka karakterizacija

6.3.18.1. Vizualizacija površinske strukture korišćenjem tehnike skenirajuće elektronske mikroskopije sa emisijom polja (FE-SEM)

Morfologija ultrazvučno i termički pretretiranih praškastih proteina belanceta i njihovih hidrolizata je okarakterisana pomoću metode skenirajuće elektronske mikroskopije sa emisijom polja (*na engl.* Field Emission Scanning Electron Microscope) (FE-SEM).



Slika 6.9. Skenirajući elektronski mikroskop sa emisijom polja (FE-SEM)

Merenja su sprovedena na skenirajućem elektronskom mikroskopu (Mira 3 XMU, Češka Republika) (Slika 6.9) pri pogonskom naponu od 5 kV. Neposredno pre analize, praškasti uzorci su premazani zlatom u atmosferi argona koristeći tehniku taloženja raspršivanjem (*na engl.* sputter deposition). Uzorak je zatim stavljen na nosač koji se nalazi u komori mikroskopa, a kao izvor elektrona korišćena je katoda smeštena u emisionoj komori. Elektroni se ubrzavaju na putu između katode i anode koje se nalaze pod visokim naponom i dalje se fokusiraju i usmeravaju pomoću magnetskih sočiva na površinu uzorka. Usko usmereni snop elektrona pada na površinu uzorka pri čemu se reflektuju elektroni visoke energije koji se detektuju kao varijacija svetlosti na katodnoj cevi, formirajući sliku koja je korišćena za analiziranje morfologije ultrazvučno i termički pretretiranih praškastih proteina belanceta i njihovih hidrolizata.

6.3.18.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

FTIR spektri ultrazvučno pretretiranih praškastih proteina belanceta i njihovih hidrolizata snimani su na ATR-FTIR spektrometru (IRAffinity-1, SCHIMADZU, Japan) koji je bio povezan sa računarom na kom se vršila softverska obrada podataka (Slika 6.10).

Mala količina fino spraćenog uzorka je nanešena na merno polje i spektri su snimani u opsegu talasnih dužina od $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$. Broj akumulacija po skenu je bio 100, a rezolucija 4 cm^{-1} . Ovako velikim brojem akumulacija znatno je smanjen odnos signal/šum i dobijeni su bolji spektri. FTIR spektar svakog uzorka je sniman tri puta i rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost sva tri ponavljanja (relativna standardna devijacija $< 5\%$), a apsorpcioni spektri su formirani oduzimanjem spektra reflektovanog zraka od

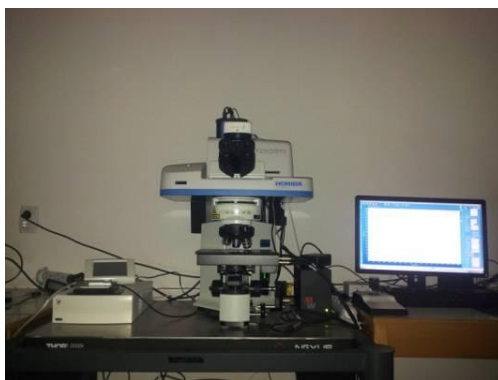
spektra referentnog zraka i naknadnim matematičkim raščlanjivanjem polihromatskog zračenja na monohromatske komponente. Spektri su prikazani u vidu frekvencija - apsorbananci.



Slika 6.10. ATR-FTIR spektrometar

6.3.18.3. Ramanova spektroskopija

Za snimanje Ramanovih spektara korišćen je XploRa Raman spektrometar proizvođača Horiba Jobin Yvon (Slika 6.11). Spektri su snimani na sobnoj temperaturi (~ 20 °C) sa laserskom diodom kao izvorom zračenja koja emituje zračenje pri talasnoj dužini od 532 nm. Snaga lasera je bila od 20 - 25 mW, a spektralni opseg snimanja je bio u intervalu od $200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$. Konačan Ramanov spektar rezultat je 10 uzastopnih snimanja uzorka tokom 15 s izlaganja zračenju (vreme akvizicije). Sva merenja su izvedena na spektrometru sa linearnom gustinom rasipanja zraka lasera od 1800 g/mm (*na engl. grating*). Dobijeni spektri su korigovani u odnosu na baznu liniju i normalizovani prema intenzitetu trake fenilalanina na 1004 cm^{-1} . Snimljeni spektri obrađeni su u programu OriginPro 8.0.



Slika 6.11. XploRa Raman spektrometar

6.3.19. Mikrobiološke analize

Određivanje antimikrobne aktivnosti različito pretretiranih proteina belanceta vršeno je na osnovu određivanja stepena redukcije broja ćelija u fiziološkom rastvoru u kome su selektovani mikroorganizmi bili izloženi dejstvu prethodno pažljivo sterilisanih proteina belanceta. Mikrobne kulture koje su se koristile u ovim ispitivanjima bile su: *Salmonella enteritidis* i *Enterobacteriaceae*.

6.3.19.1. Ukupan sadržaj mikroorganizama

Ukupan broj mikroorganizama određen je metodom brojanja ćelija na čvrstim hranljivim podlogama (*na engl.* plate count method). 20 ml uzorka se dodaje u 180 ml sterilnog fiziološkog rastvora (0,9% vodeni rastvor NaCl) i homogenizuje. Iz prethodno pripremljenih razblaženja ćelija u fiziološkom rastvoru, 1 ml uzorka se stavlja u petri šolju nalivenu sa oko 15 ml otopljenog agara (PCA agar, ~44 °C). Uzorci su zatim inkubirani 48 h na 30 °C. Nakon završenog perioda inkubacije, ukupan broj ćelija određen je na osnovu validnog broja kolonija formiranih na petri šolji (*na engl.* CFU – colony forming unit).

Enterobacteriaceae

20 ml uzorka se dodaje u 180 ml sterilnog fiziološkog rastvora (0,9% vodeni rastvor NaCl) i homogenizuje. Alikvot od 1 ml prethodno pripremljenih razblaženja ćelija u fiziološkom rastvoru se meša sa 10 ml EE bujona (*Enterobacteriaceae* enrichment broth) (Tabela 6.6) i termostatira na 37 °C tokom 24 h. Nakon inkubacije, uzorci se ezom prebacuju na ploču sa selektivnim agarom (VRBG agar, *na engl.* Violet Red Bile Glucose) i termostatiraju na 37 °C u toku 24 h. Pozitivan test na prisustvo *Enterobacteriaceae* je ustanovljen karakterističnom bojom kolonija.

Tabela 6.6. Sastav EE bujona

Reagensi	Količina
Pepton iz životnjiskog tkiva	10,0 g/l
Dekstroza	5 g/l
Dinatrijum-fosfat	6,45 g/l
Monokallijum-fosfat	2,0 g/l
Žuč vola, prečišćena	20,0 g/l
Brilijant zeleni	0,0135 g/l

*Krajnji pH na 25 °C 7,2 ± 0,2

***Salmonella* spp.**

20 ml uzorka se dodaje u 225 ml puferizovane peptonske vode (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd, Mumbai, India) i inkubira 18 h na 37 °C. Nakon toga se 0,1 ml inkubiranog uzorka prebacuje u 10 ml bujona sa sojom (Rappaport-Vassiliadis (RSV), HiMedia Laboratories Pvt.Ltd, Mumbai, India) i inkubira na 41,5 °C tokom 24 h. Uporedo se, takođe, 1 ml inkubiranog uzorka dodaje u 10 ml Muller-Kauffman tetratonat novobiocin bujona (MKTTn, HiMedia Laboratories Pvt.Ltd, Mumbai, India). i inkubira na 37 °C u toku 24 h. Nakon završene inkubacije, RSV bujonska kultura se ezom prebacuju u petri šolju sa XLD (Xylose Lysine Deoxycholate, HiMedia Laboratories Pvt.Ltd, Mumbai, India) agarom i inkubira 24 h na 37 °C. Ista procedura je ponovljena i za uzorke u MKTTn bujonu. Pozitivan test na prisustvo *Salmonella* spp. je ustanovljen karakterističnom bojom kolonija. Sastav RSV i MKTTn bujona dati su u Tabeli 6.7.

Tabela 6.7. Sastav RSV i MKTTn bujona

Reagensi za RSV bujon	Količina	Reagensi za MKTTn bujon	Količina
Sojin pepton	4,5 g/l	Pepton iz životinjskog tkiva	4,3 gl
Natrijum-hlorid	8,0 g/l	Hidrolizat kazeina	8,6 g/l
Dikalijum-fosfat	0,4 g/l	Žuč vola	4,75 g/l
Kalijum-dihidrogen fosfat	0,6 g/l	Natrijum-hlorid	2,6 g/l
Magnezijum-hlorid heksahidrat	29,0 g/l	Kalcijum-karbonat	38,7 g/l
Malahit zeleni	0,036 g/l	Natrijum-tiosulfat pentahidrat	47,8 g/l
		Brilijant zeleni	0,0095 g/l

* pH nakon sterilizacije RSV na 25 °C bio je $5,2 \pm 0,2$;
krajnji pH za MKTTn bujon na 25 °C bio je $8,2 \pm 0,2$.

6.3.20. Statistička obrada eksperimentalnih podataka

Svi eksperimenti su izvedeni u triplikatu, a rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija za svako merenje. U toku analize podataka, a u cilju procene statističkog značaja rezultata korišćena je analiza varijanse (ANOVA). U zavisnosti od broja parametara čiji je uticaj ispitivan za poređenje aritmetičkih sredina, korišćena je jednostruka (One-way ANOVA) ili dvostruka analiza varijanse (Two-way ANOVA) sa naknadnim Tukey testom. Razlike u vrednostima su smatrane statistički značajnim ukoliko je p vrednost bila manja od 0,05 ($p < 0,05$).

7. REZULTATI I DISKUSIJA

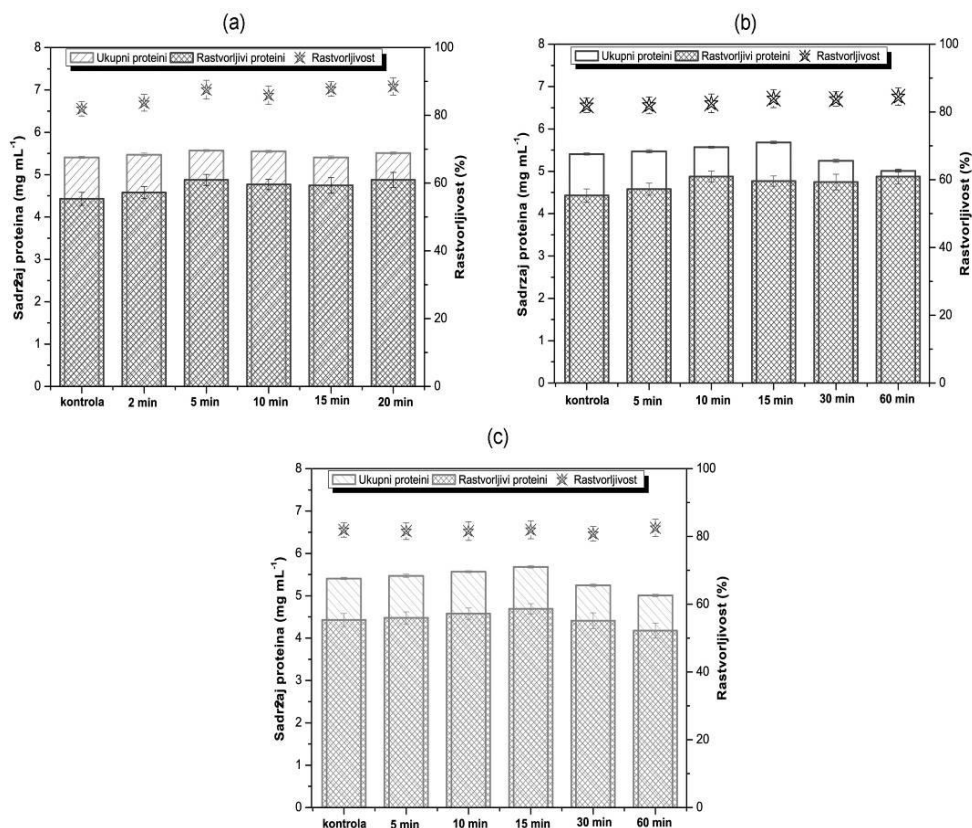
Kako je uticaj ultrazvuka na funkcionalna, strukturna i fizičko-hemijska svojstva proteina belanceta veoma malo izučavan, prvi deo istraživanja bio je usmeren ka ispitivanju dejstva različitih ultrazvučnih pretretmana na gore navedena svojstva. Kao što je već napomenuto u teorijskom delu, funkcionalna svojstva proteina uslovljena su njihovom molekulskom strukturom koja je posledica inter- i intra-molekulskih interakcija. Promene funkcionalnih svojstava dejstvom ultrazvuka praćene su ispitivanjem uticaja jačine ultrazvučnih talasa (frekvencija), dužine ultrazvučnog pretretmana i vrste ultrazvučnog uređaja. Svi eksperimenti izvedeni su u termički kontrolisanim uslovima pri konstantnoj temperaturi od 25 ± 1 °C i pri konstantnim pH vrednostima (promena je praćena merenjem pH vrednosti pre i posle soniciranja). Izračunate vrednosti akustične snage ultrazvuka od 20 kHz, 35 kHz i 40 kHz su iznosile 35,4 W, 65,7 W, 21,3 W, redom.

7.1. UTICAJ DEJSTVA ULTRAZVUČNIH TALASA NA TEHNOLOŠKO-FUNKCIONALNA SVOJSTVA PROTEINA BELANCETA

7.1.1. Rastvorljivost (R_0)

10%-tni vodeni rastvori proteina belanceta tretirani su ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz (UZS-20kHz) u vremenskim intervalima od 2, 5, 10, 15 i 20 min, kao i ultrazvukom u kupatilima frekvence 40 kHz (UZK-40kHz) i frekvence 35 kHz (UZK-35kHz) tokom 5, 10, 15, 30 i 60 minuta. Rastvorljivost proteina (R_0) je ispitana u funkciji dužine trajanja pretretmana i rezultati su predstavljeni na Slici 7.1.

Zbog znatnog uticaja rastvorljivosti na druga funkcionalna svojstva i sam kvalitet krajnjeg proizvoda, rastvorljivost proteina je bitan faktor koji je potrebno ispitati pre potencijalne primene krajnjeg proizvoda. Na primer, kako bi se dobio prehrambeni proizvod koji poseduje dobre funkcionalne karakteristike (geliranje, emulgovanje, penjenje) poželjno je prisustvo veoma rastvorljivih proteina.



Slika 7.1. Rastvorljivost proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz (a), ultrazvukom u kupatilu frekvence 40 kHz (b) i ultrazvukom u kupatilu frekvence 35 kHz (c) u funkciji vremena pretretmana

Na Slici 7.1. data je zavisnost rastvorljivosti proteina belanceta u zavisnosti od vremena ultrazvučnog pretretmana. Na osnovu rezultata prikazanih na Slici 7.1a, može se uočiti da je rastvorljivost svih uzoraka značajno povećana ($p < 0,05$) nakon pretretmana UZS-20kHz u poređenju sa netretiranim uzorkom (kontrolni uzorak). Najveća rastvorljivost zabeležena je nakon 15 min i iznosila je 88,54%. Takođe, rezultati dobijeni tretiranjem proteina belanceta u UZK-40kHz i UZK-35kHz (Slika 7.1b,c) pokazuju da je došlo do povećanja R_0 u svim ispitanim uzorcima. I u ovom slučaju, vreme pretretmana od 15 min, pokazalo se kao optimalno, a dobijene vrednosti R_0 iznosile su 83,79% i 81,95% za UZK-40kHz i UZK-35kHz, redom.

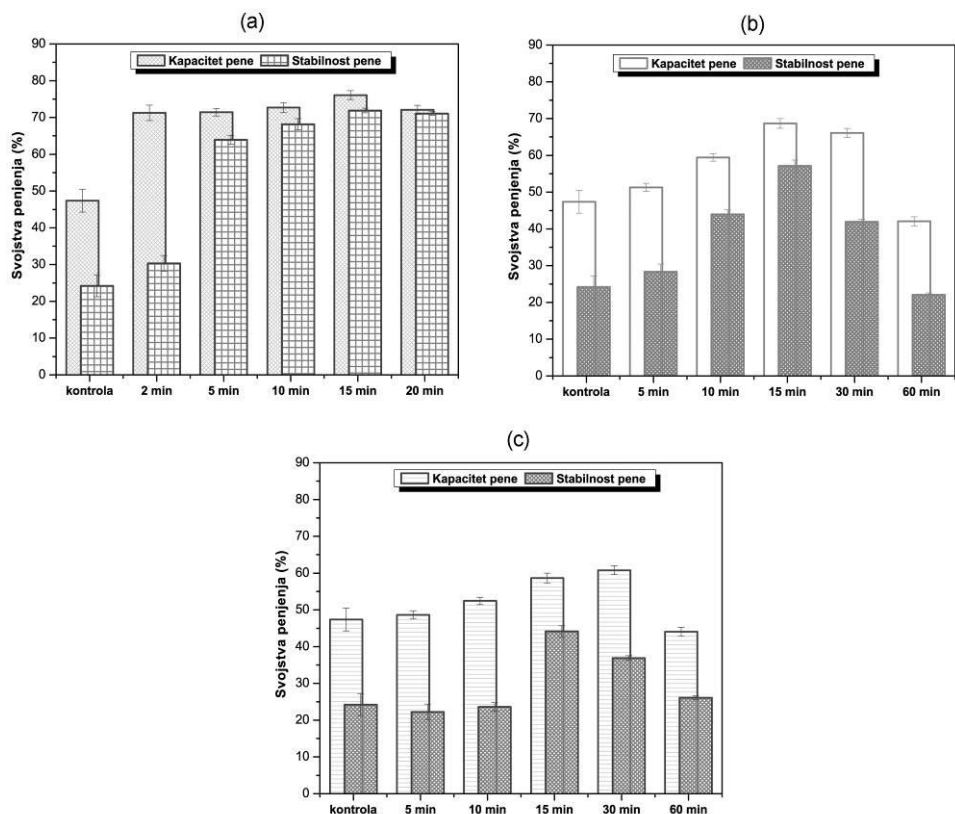
Poboljšana rastvorljivost ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta može se pripisati uticaju ultrazvučnih talasa, emitovanih od strane ultrazvučne sonde, na konformaciju samih proteina i njihovu strukturu. Nakon sonikacije, došlo je do reorganizacije hidrofилnih

aminokiselinskih ostataka iz unutrašnjosti molekula proteina usled čega su oni postali dostupni molekulima vode i na taj način im se povećala rastvorljivost. Takođe, rezultati mogu ukazati da se broj naelektrisanih grupa (NH_4^+ , COO^-) povećao, što je uticalo na uspostavljanje jačih interakcija između molekula vode i molekula proteina usled izraženijih elektrostatičkih sila. Rezultati dobijeni u ovom radu su u saglasnosti sa literaturnim podacima objavljenim u radovima Jambrak i sar. (2009) i Đandun (Yanjun) i sar. (2014) [174,151]. Prema njihovim rezultatima ultrazvučni pretretman doveo je do povećanja rastvorljivosti izolata proteina soje i koncentrata proteina mleka. Najbolji rezultati dobijeni su nakon 30 min (78%) i 5 min (88,3%) pretretmana ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz za izolat proteina soje i koncentrat proteina mleka, redom. U poređenju sa rezultatima u ovom radu, ove vrednosti su jako bliske, ali treba napomenuti da je kod Jambrak i sar. (2009) i Đandun i sar. (2014) zabeležen znatan porast temperature nakon ultrazvučnog pretretmana (temperature i do 50 °C), te se porast rastvorljivost može pripisati uticaju termosonikacije (ne samo sonikacije), jer je poznato da se rastvorljivost proteina povećava na temperaturama od 40 do 50 °C [189]. Eksperimenti u okviru ove teze su izvedeni pri konstantnoj temperaturi od 25 ± 1 °C, pa se sa većom sigurnošću može tvrditi da je povećana rastvorljivost isključivo posledica primene ultrazvučnog pretretmana.

7.1.2. Kapacitet i stabilnost pene

Komercijalna primena proteina belanceta u prehrambenoj industriji veoma zavisi od svojstava penjenja koja se definišu pomoću dve glavne veličine, a to su kapacitet pene (KP) i stabilnost pene (SP). Poznato je da su kapacitet pene i njena stabilnosti neophodni za održavanje stabilne strukture i teksture mnogih prehrambenih proizvoda na bazi proteina belanceta, kao što su kolači, poslastice, šlag kreme i puslice [247].

Svojstava penjenja ultrazvučno pretretiranih (20 kHz, 35 kHz i 40 kHz) proteina belanceta u funkciji vremena pretretmana prikazana su na Slici 7.2.



Slika 7.2. Svojstva penjenja proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz (a), u ultrazvučnom kupatilu frekvence 40 kHz (b) i u ultrazvučnom kupatilu frekvence 35 kHz (c) u funkciji vremena pretretmana

Kod pretretmana ultrazvukom visokog intenziteta frekvence 20 kHz (Slika 7.2a) uočena je vremenska zavisnost u pogledu stabilnosti pene, dok se kapacitet pene nije statistički značajno ($p > 0,05$) menjao tokom vremena, ali je bio izrazito veći u poređenju sa kontrolnim uzorkom (bez pretretmana). Već nakon 2 min pretretmana, postigao se 50% veći kapacitet pene (71,26%) u odnosu na kontrolni uzorak (47,36%), dok se najstabilnija pena dobila nakon 15 min ultrazvučnog pretretmana (71,91%). Kod pretretmana UZK-40kHz (Slika 7.2b) zabeležen je porast *KP* i *SP* tokom prvih 15 min pretretmana, a nakon toga usledio je pad, ali su dobijene vrednosti *KP* i *SP* i dalje bile veće u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Najstabilnija pena dobijena je nakon 15 min pretretmana (57,15%), a nakon ovog vremena postignut je i 45% veći *KP* (68,67%) u odnosu na kontrolni uzorak. Vreme pretretmana od 15 min dalo je najbolje rezultate i za pretretman UZK-35kHz, ali u

poređenju sa prethodna dva pretretmana, ostvarene su znatno niže vrednosti *KP* i *SP* (Slika 7.2c).

Pregledom literature ustanovljeno je da se primenom ultrazvučnog pretretmana ostvaruje značajno povećanje kapaciteta i stabilnosti pene što se objašnjava efektom mehaničke homogenizacije uzorka ili povećanjem površinske hidrofobnosti molekula proteina koja dovodi do efikasnije adsorpcije molekula na površini vazduh-voda [354,355]. Efektom mehaničke homogenizacije uzorka ultrazvukom postiže se ravnomernija raspodela proteina, a takođe i delimično odmotavanje molekula proteina što dovodi do poboljšanja svojstava penjenja.

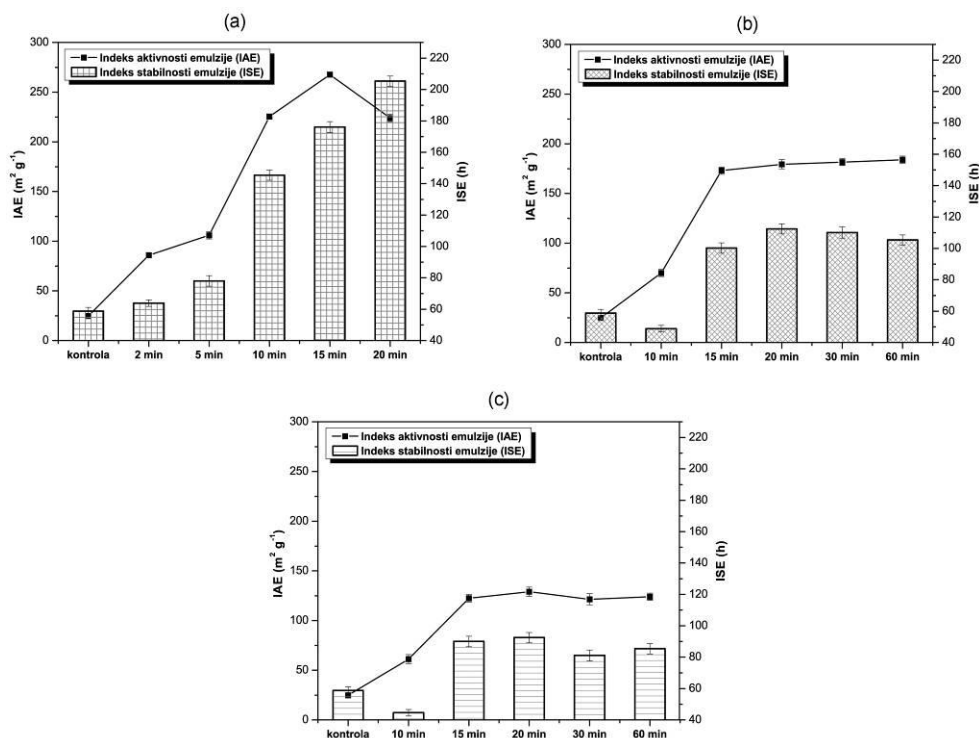
Nasuprot rezultatima dobijenim u ovom radu, Ksiong (Xiong) i sar. (2016) su došli do zaključka da se ultrazvučnim pretretmanom (20 kHz, sonda) ovalbumina poboljšava kapacitet penjenja, ali da stabilnost pene ostaje nepromenjena [356]. Neslaganje rezultata može se pripisati kompleksnosti proteina belanceta čiji sastav čini preko 30 različitih proteinskih frakcija, te je očekivano potpuno drugačije ponašanje u poređenju sa čistim ovalbuminom. Sve proteinske frakcije se smatraju zaslužnim za denaturaciju i odmotavanje molekula proteina belanceta i samim tim na promenu svojstava penjenja.

Uticaju ultrazvučnog pretretmana na svojstva penjenja proteina belanceta u literaturi nije posvećeno mnogo pažnje. Jedini dostupni podaci su oni do kojih su došli Arzeni i sar. (2012) ispitujući uticaj ultrazvuka frekvence 20 kHz na funkcionalnost proteina belanceta, pri čemu je ustanovljeno da su svojstva penjenja narušena, što je u suprotnosti sa rezultatima ostvarenim u okviru ovog istraživanja [37]. Dostupni literaturni podaci su bazirani uglavnom na primeni drugih pretretmana, kao što su pretretman visokim pritiskom, termički pretretman ili UV zračenje, a dobijeni rezultati se dosta razlikuju. Pregledom literature utvrđeno je da tretiranjem belanceta UV zračenjem dolazi do povećanja sposobnosti penjenja, kao i do povećanja stabilnosti pene [216]. U studiji Strohalma (Strohalma) i sar. (2000) nisu zabeležene značajne promene u svojstvima penjenja proteina belanceta pretretiranih visokim pritiskom do 400 MPa, dok su Ričvin (Richwin) i sar. (1992) ustanovili da dolazi do narušavanja svojstava penjenja proteina belanceta nakon pretretmana pri pritisku od 400 MPa [357,358]. Nasuprot ovim saznanjima, Vander Planken (Van der Plancken) i sar. (2007) su pokazali da su termički pretretman i tretman

visokim pritiskom značajno doprineli poboljšanju svojstava penjenja proteina belanceta [222].

7.1.3. Emulgujuća svojstva

Emulgujuća svojstva ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta su ispitana i upoređena sa netretiranim uzorkom (kontrola). Dobijeni rezultati predstavljeni su na Slici 7.3. Za ultrazvučni pretretman od 20 kHz zabeležen je porast indeksa aktivnosti emulzije (IAE) i indeksa stabilnosti emulzije (ISE) sa povećanjem vremena pretretmana. Najveća vrednost IAE od $267,60 \pm 2,45 \text{ m}^2/\text{g}$ dobijena je nakon 15 min, dok su najbolji rezultati za ISE od $205,37 \pm 3,24 \text{ h}$ postignuti nakon 20 min soniciranja. Najveće povećanje IAE i ISE zabeleženo kod ultrazvučne sonde frekvence 20 kHz može se dovesti u vezu sa konformacionim promenama molekula proteina belanceta izazvanim dejstvom ultrazvučnih talasa koji su doveli do razlaganja agregiranih proteinskih lanaca na manje jedinice, i to prvo delovanjem ultrazvučnih talasa na centralni deo molekula, a zatim i na bočne lance. Razlaganje složenih agregata proteina belanceta na manje jedinice uticalo je na povećanje njihove sposobnosti da stabilizuju međugranični sloj ulje/voda, uglavnom zbog veće pokretljivosti. Na međugraničnoj površini došlo je do orijentacije lipofilnih delova molekula proteina ka uljanoj fazi, dok su hidrofilni delovi bili orijentisani ka vodenoj fazi. Ova pojava dovela je do redukcije površinskog napona na granici faza ulje/voda usled čega je sposobnost formiranja emulzije povećana.



Slika 7.3. Emulgujuća svojstva proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz (a), u ultrazvučnom kupatilu frekvence 40 kHz (b) i u ultrazvučnom kupatilu frekvence 35 kHz (c) u funkciji vremena pretretmana

Dejstvom ultrazvuka frekvence 40 kHz, takođe je došlo do statistički značajnog ($p < 0,05$) povećanja IAE i ISE. Najveće vrednosti dobijene su nakon 15 min pretretmana, dok su najmanje zabeležene nakon tretmana od 10 min. U ovom slučaju veća je frekvencija, a manja snaga, ali i način prenosa ultrazvučnih talasa u kupatilu. Dolazi do određenog mehaničkog cepanja agregiranih proteinskih čestica, koje nije praćeno denaturacijom samih proteina. Tretiranje ultrazvukom 35 kHz ne dovodi do značajnih promena IAE i ISE tokom vremena pretretmana. Moguće objašnjenje je da usled manje frekvencije ultrazvuka dolazi do reverzibilnih promena konformacije proteinskih molekula, jer ne dolazi do stvaranja zona sa dovoljno visokim pritiskom i temperaturom usled kavitacionog fenomena, pa se proteini nakon tretmana vraćaju u svoje prvobitno stanje (nativna konformacija). Očigledno da ovaj tip ultrazvuka nema dovoljan intenzitet i snagu da bi prouzrokovao neke mehaničke i fizičke promene u sistemu na koji deluje. Ovde se jasno vidi razlika između frekvencije i intenziteta ultrazvuka. Primećen je suprotan učinak tretiranja kupatilima na IAE i ISE.

Pretretman sondom frekvence 20 kHz uticao je na poboljšanje navedenih svojstava, dok su ultrazvučna kupatila dala manji doprinos i to pogotovo kupatilo frekvence 35 kHz.

U literaturi je, takođe, pronađeno da su globularni proteini, kao što su glicinin iz soje (11S) i izolat proteina soje pokazali bolje emulgujuće sposobnosti sa povećanjem vremena ultrazvučnog pretretmana, što je u saglasnosti sa rezultatima u okviru ovog istraživanja [359,174]. Neki istraživači smatraju da je poboljšanje emulgujućih svojstava proteina u direktnoj vezi sa povećanjem rastvorljivosti i površinske hidrofobnosti proteina. Postoji i mišljenje da ultrazvučni pretretman utiče različito na emulgujuću sposobnost proteina, u zavisnosti od molekulske mase proteina, njihove prirode, ali i uslova sredine, kao što je, na primer, jonska jačina rastvora proteina [160,162,359].

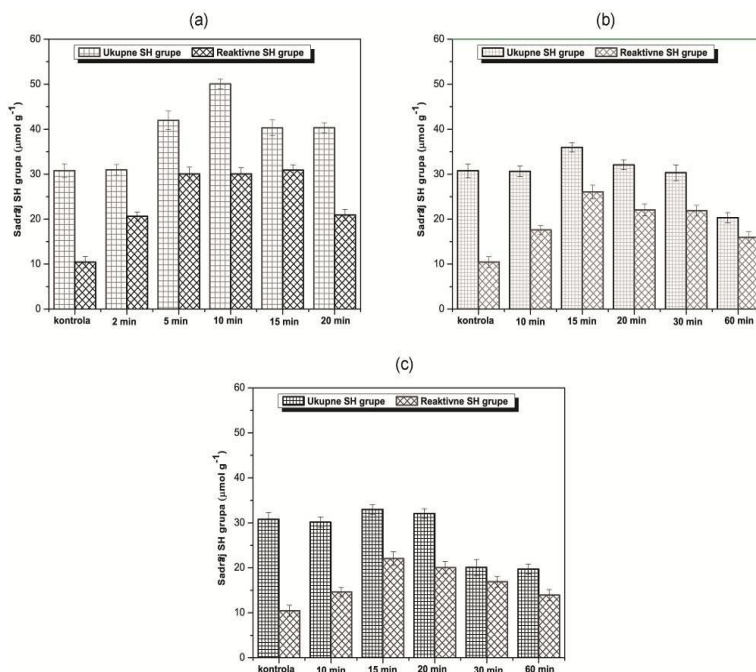
7.2. UTICAJ DEJSTVA ULTRAZVUČNIH TALASA NA POVRŠINSKE KARAKTERISTIKE MOLEKULA PROTEINA BELANCETA

7.2.1. Sadržaj sulfhidrilnih grupa

Rezultati ukupnih i reaktivnih sulfhidrilnih grupa (SH) prikazani su na Slici 7.4. Nakon pretretmana UZS-20kHz zabeležen je statistički značajan porast ukupnih sulfhidrilnih grupa za vremenske intervale do 10 min, nakon čega je usledio pad (Slika 7.4a). Sličan trend je ostvaren i za reaktivne sulfhidrilne grupe, gde je najveći sadržaj sulfhidrilnih grupa detektovan nakon 15 min ultrazvučnog pretretmana. Može se reći da je tokom prvih 10 do 15 min pretretmana, najveći deo sulfhidrilnih grupa lociranih u unutrašnjosti molekula proteina belanceta detektovan usled denaturacije izazvane ultrazvučnim talasima. Smanjen sadržaj sulfhidrilnih grupa nakon produženog dejstva ultrazvuka može se objasniti oksidacijom sulfhidrilnih grupa i formiranjem disulfidnih veza (S-S) ili SH/S-S veza unakrsnim reakcijama. Ovi rezultati su u korelaciji sa prethodno analiziranim funkcionalnim svojstvima, pa se može pretpostaviti da je smanjen sadržaj reaktivnih sulfhidrilnih grupa nakon 15 min pretretmana UZS-20kHz posledica formiranja intramolekulskih disulfidnih veza nastalih usled oksidacije izazvane ultrazvučnim talasima, a da je smanjen sadržaj reaktivnih i ukupnih sulfhidrilnih grupa nakon 20 min posledica formiranja intermolekulskih S-S veza koje dovode do stvaranja agregata. Preliminarna pretpostavka se odnosila na to da sonikacija dovodi do hemolitičkog cepanja molekula ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{OH}^- + \text{H}^+$; $2\text{OH}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+$) vode pri čemu nastaju slobodni radikali koji

dovode do strukturnih promena molekula proteina. Detaljnija strukturna analiza bila je neophodna da bi se ova tvrdnja potvrdila, što će biti opisano u odeljku 7.5. Sličan trend ostvaren je i nakon pretretmana UZK-40kHz i UZK-35kHz, gde je optimalno vreme za oba pretretmana bilo 15 min, nakon čega je došlo do pada vrednosti sulfhidrilnih grupa (Slika 7.4b,c).

Podaci iz literature su veoma raznoliki. Galseren (Gülseren) i sar. (2007) i Hu i sar. (2013) su utvrdili smanjen sadržaj sulfhidrilnih grupa sa vremenom soniciranja, dok su Arzeni i sar. (2012) i Čandrapala (Chandrapala) i sar. (2010) zabeležili da ultrazvučni pretretman ne utiče značajno na sadržaj sulfhidrilnih grupa ispitivanih proteina [156,37,359]. Slično rezultatima dobijenim u ovom istraživanju, Lei i sar. (2011) su ustanovili da se sadržaj ukupnih SH grupa ovotransferina značajno povećao sa vremenom pretretmana od 30 i 60 s pri frekvenciji ultrazvuka od 20 i 60 kHz, redom i da je nakon toga počeo da opada [322]. Međutim, sadržaj reaktivnih sulfhidrilnih grupa u ovom slučaju je dao drugačiji trend, pokazujući veće vrednosti na višoj frekvenci (60 kHz) i sa dužim vremenom pretretmana, što nije u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u okviru ovog istraživanja.



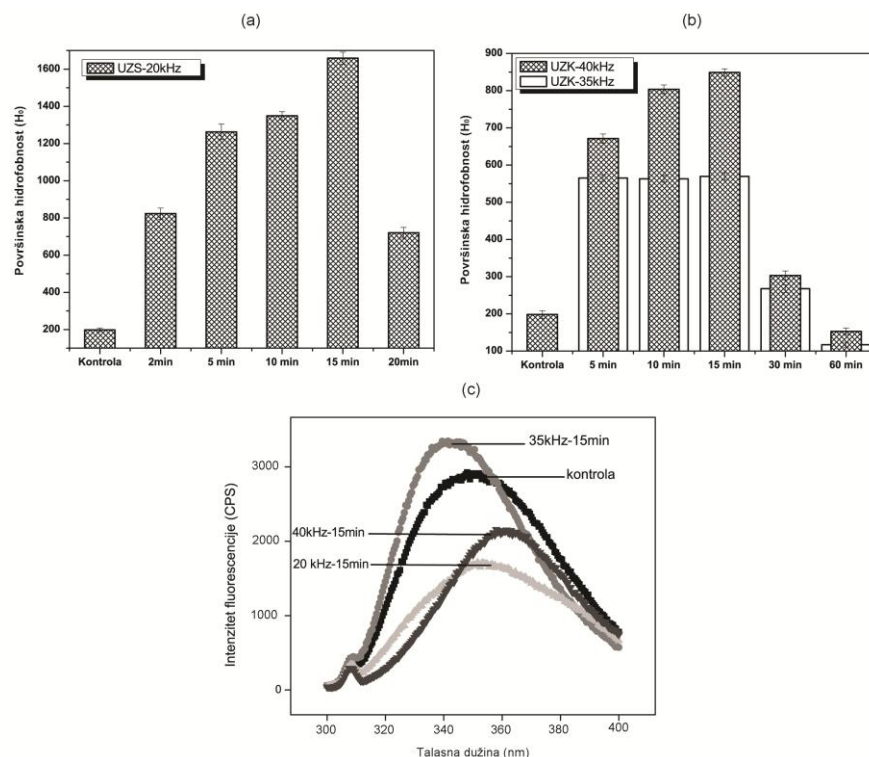
Slika 7.4. Sadržaj sulfhidrilnih grupa proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz (a), ultrazvučnim kupatilom frekvence 40 kHz (b) i ultrazvučnim kupatilom frekvence 35 kHz (c) u funkciji vremena pretretmana

Bitno je naglasiti da broj S-S veza unutar svakog pojedinačnog proteina belanceta utiče na rezultate. Najzastupljeniji protein u belancetu, ovalbumin, ima samo jednu S-S vezu, dok ovotransferin sadrži čak petnaest S-S veza, ovomucin devet, a lizozim četiri [3,360,361]. U ovom radu istraživanja su rađena sa kompleksnom smešom proteina belanceta (ne samo sa jednim model proteinom), pa otuda i objašnjenje zašto su najbolji rezultati ostvareni tek nakon 10 ili 15 minuta pretretmana, jer je potrebno duže vreme izlaganje ultrazvučnim talasima kako bi se raskinuo što veći broj S-S veza unutar svih proteina prisutnih u belancetu.

7.2.2. Površinska hidrofobnost (H_0)

Značaj hidrofobnih interakcija u održavanju stabilnosti, konformacije i funkcionalnosti proteina je odavno poznat. Površinska hidrofobnost proteina predstavlja strukturnu karakteristiku na osnovu koje se procenjuje da li je došlo do konformacionih promena molekula proteina, što bi naknadno uticalo na njihova funkcionalna svojstva [362].

Uticao ultrazvučnog pretretmana na površinsku hidrofobnost proteina belanceta predstavljena je na Slici 7.5. Kao što se može primetiti, H_0 raste sa vremenom pretretmana do 15 min kod UZS-20kHz i UZK-40kHz, dok kod UZK-35kHz nije zabeležena značajna promena ($p > 0,05$) H_0 tokom prvih 15 min pretretmana. Za vremenske intervale veće od 15 min zabeležen je drastičan pad H_0 kod sva tri ultrazvučna pretretmana. U poređenju sa kontrolnim uzorkom, uočena je povećana površinska hidrofobnost proteina belanceta nakon primene sva tri ultrazvučna pretretmana. Kao najefikasniji, pokazao se pretretman UZS-20kHz, gde je nakon 15 min pretretmana H_0 povećana osam puta ($H_0 = 1659,02$) u odnosu na kontrolni uzorak ($H_0 = 198,22$). Nakon 15 min pretretmana UZK-40kHz H_0 je povećana četiri puta ($H_0 = 848,84$), dok je za isto vreme pretretmana UZK-35kHz to povećanje bilo tri puta veće u poređenju sa kontrolom ($H_0 = 569,57$).



Slika 7.5. Emisioni spektar fluorescencije (c) i površinska hidrofobnost proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz (a) i ultrazvučnim kupatilima frekvence 40 kHz i 35 kHz (b) u funkciji vremena pretretmana

Ovi rezultati ukazuju na to da je nakon ultrazvučnog pretretmana došlo do određenog odmotavanja proteina belanceta i slabljenja hidrofobnih interakcija usled čega su hidrofobne grupe i regioni iz unutrašnjosti molekula postali dostupni molekulima rastvarača (voda). Globularna struktura proteina belanceta je narušena i molekuli proteina su infiltrirani molekulima rastvarača [188]. Pad H_0 zabeležen nakon 20 min pretretmana UZS-20 kHz i nakon 30 i 60 min pretretmana UZK-40kHz i UZK-35kHz je posledica agregacije proteina belanceta. Nastali agregati zaštitili su hidrofobne regione molekula proteina i na taj način smanjili broj dostupnih hidrofobnih grupa za koje bi se vezala 8-anilino-1-naftalensulfonska kiselina (ANS) putem nepolarne anilin-naftalenske grupe. Kako je ANS anjonska fluorescentna boja, enregija neophodna za vezivanje ANS uslovljena je jačinom elektrostatičkih interakcija između boje i molekula proteina [363]. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Galseren i sar. (2007) koji su došli do zaključka da je površinska hidrofobnost goveđeg seruma albumina (BSA) povećana nakon 45 min ultrazvučnog

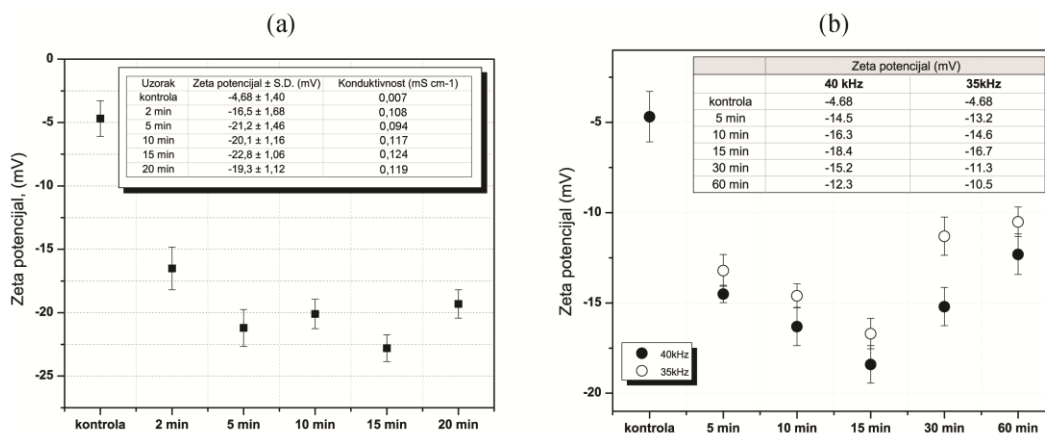
pretretmana snage 20 W cm^{-1} . Takođe, Čandrapala i sar. (2011) su utvrdili da dolazi do povećanja H_0 koncentrata proteina surutke nakon 5 min ultrazvučnog pretretmana frekvence 20 kHz i snage 31 W [105].

Takođe, na Slici 7.5c može se videti da je ultrazvučni pretretman uticao na pomeranje emisionog maksimuma (λ_{max}) ANS-protein kompleksa u opsegu od 338 nm do 380 nm (batohromni efekat). Spektar fluorescencije potiče uglavnom od aminokiselinskih ostataka triptofana, tirozina i fenilalanina i jačina intenziteta fluorescencije ovih aminokiselina se smanjuje zbog povećanja njihove izloženosti molekulima rastvarača (voda) [364]. Za sve uzorke su dobijeni karakteristični spektri sa emisionim maksimumom na 362 nm koji odgovara fluorescentnom profilu triptofana u jako hidrofobnoj sredini, kao što je unutrašnjost globularnih proteina. Batohromni efekat primećen kod UZS-20 kHz i UZK-40kHz u odnosu na kontrolni uzorak i UZK-35kHz je posledica veće izloženosti unutrašnjih hidrofobnih grupa molekulima rastvarača nakon primene ova dva pretretmana [365]. Takođe, može se zaključiti da proteini belanceta pretretirani UZS-20 kHz i UZK-40kHz imaju fleksibilniju konformaciju i terciarnu strukturu u odnosu na kontrolni uzorak i uzorak pretretiran UZK-35kHz [366].

7.2.3. Zeta potencijal (Z_0)

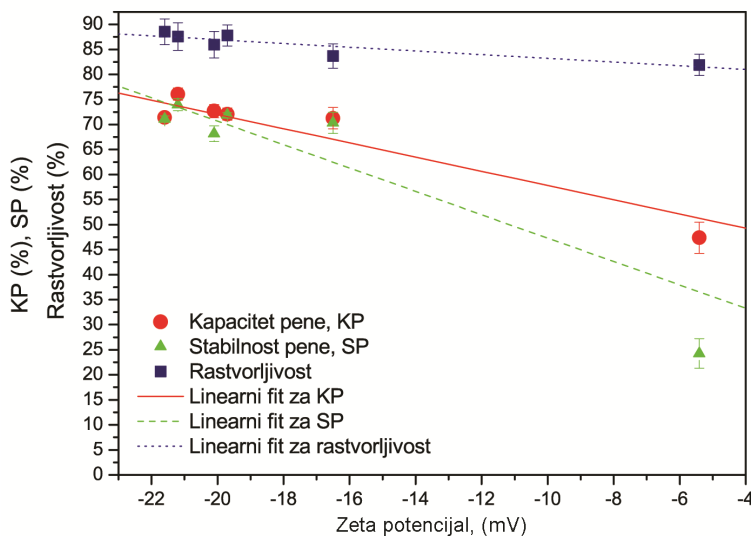
Dobijene vrednosti zeta potencijala za sve uzorke pretretirane ultrazvučnim talasima različite frekvence su negativne (Slika 7.6), što ukazuje na to da svi uzorci sadrže negativno naelektrisane aminokiseline. Uočeno je da sa porastom vremena pretretmana dolazi do značajnog porasta ($p < 0,05$) vrednosti zeta potencijala za sva tri ultrazvučna pretretmana. Najveće negativne vrednosti dobijene su za pretretman UZS-20kHz nakon 15 min ($-22,8 \pm 1,06 \text{ mV}$), zatim za UZK-40kHz nakon 15 min ($-18,4 \pm 1,04 \text{ mV}$), i na kraju za UZK-35kHz nakon 15 min ($-16,7 \pm 0,84 \text{ mV}$). Pregledom literature, ustanovljeno je da dolazi do povećanja Z_0 proteina belanceta pretretiranih pulsniim električnim poljem (od $-8,02$ do $-9,9 \text{ mV}$), a najveća vrednost je dobijena nakon $800 \mu\text{s}$ pretretmana i iznosila je $-9,9 \pm 0,52 \text{ mV}$ [367]. U poređenju sa rezultatima dobijenim u okviru ove teze, može se reći da je ultrazvučni pretretman značajno doprineo održavanju stabilnosti proteina belanceta u odnosu na pretretman pulsniog električnog polja. Rezultati ukazuju na to da su stabilnost i elektrokinetički potencijal proteina belanceta zadržani, pa čak i povećani nakon pretretmana ultrazvučnim talasima. Povećanje negativnog naelektrisanja može se tumačiti

elektrostatičkim odbijanjem čestica koje je uticalo na razaranje prisutnih proteinskih aglomerata i ujedno sprečilo naknadnu aglomeraciju čestica. Poređenja radi, ovo povećanje elektrostatičkih odbijnih sila, takođe, utiče i na povećanu rastvorljivost, kao i na sadržaj sulfhidrilnih grupa, pa upoređujući ove rezultate sa rezultatima prikazim u poglavlju 7.1.1. i 7.2.1 može se konstatovati dobro slaganje rezultata. Proteini belanceta pretretirani 15 min sondom frekvence 20 kHz su se pokazali kao najstabilniji i poseduju molekule sa dovoljnom količinom negativnog naelektrisanja koje ne dovodi do aglomeracije i fluktuacije molekula proteina belanceta.



Slika 7.6. Naelektrisanje proteina belanceta (Z_o) pretretiranih ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz (a) i ultrazvučnim kupatilima frekvence 40 kHz i 35 kHz (b) u funkciji vremena pretretmana

S tim u vezi, kako bi se bolje razumela povezanost naelektrisanja i tehničko-funkcionalnih svojstava proteina, ispitana je korelacija rezultata zeta potencijala i prethodno analiziranih funkcionalnih svojstava (rastvorljivost, kapacitet i stabilnost pene) za tretman sondom frekvence 20 kHz. Rezultati su predstavljeni na Slici 7.7.

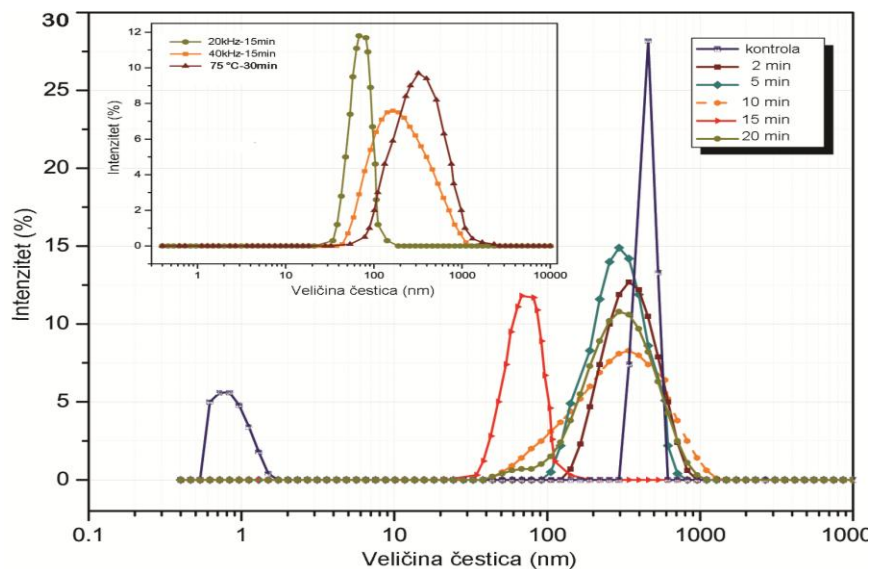


Slika 7.7. Korelacija između kapaciteta pene, stabilnosti pene i rastvorljivosti, sa jedne strane i zeta potencijala proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz, sa druge

Kao što se može primetiti, postoji linearna korelacija između zeta potencijala i ostvarenog povećanja rastvorljivosti (R_0), kapaciteta pene (KP) i stabilnosti pene (SP). Nije ustanovljena direktna korelacija između zeta potencijala i IAE i ISE, stoga ti rezultati nisu ni prikazani. Vrednosti koeficijenta linearnosti (R^2) za R_0 , KP i SP su 0,904, 0,931 i 0,923, redom, a dobijeni nagibi su -1,378, -1,465 i -3,002, redom. Iz vrednosti nagiba može se zaključiti da ultrazvučni pretretman sondom frekvence 20 kHz ima najveći uticaj na stabilnost pene, jer je apsolutna vrednost nagiba, u poređenju sa rastvorljivošću i kapacitetom pene. Na osnovu analiziranih rezultata, možemo zaključiti da su svojstva penjenja proteina belanceta pretretiranih sondom frekvence 20 kHz u direktnoj vezi i sa naelektrisanjem proteina i sa njihovom veličinom čestica (Odeljak 7.3.). Nasuprot ovome, veza između veličine čestica/zeta potencijala i emulgujućih svojstava nije jasno definisana, pa se pretpostavilo da neki drugi faktori, kao što je, na primer, promena u sekundarnoj strukturi proteina, imaju značajan uticaj na emulgujuća svojstva proteina belanceta. Kako bi se ova pretpostavka potvrdila, dalja istraživanja su bila bazirana upravo na ispitivanju uticaja ultrazvuka različite frekvence na strukturu proteina belanceta (Odeljak 7.5).

7.3. UTICAJ ULTRAZVUČNOG PRETRETMA NA VELIČINU ČESTICA

Raspodela veličina čestica proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz (UZS-20 kHz) u funkciji vremena pretretmana data je na Slici 7.8. Dosadašnje analize su pokazale da je veći uticaj na proteine belanceta imao UZK-40 kHz, u poređenju sa UZK-35kHz, te su stoga na dijagramu prikazani samo rezultati dobijeni nakon 15 min UZK-40 kHz (umetnuti dijagram). Kako je jedan od ciljeva bio da se ispita i uticaj različitih tipova ultrazvučnih uređaja (sonda i kupatilo) na funkcionalnost proteina belanceta, pretretman UZK-40 kHz je izabran kao pogodan za dalje analize. Poređenja radi, analize su izvedene i za konvencionalni termički pretretman proteina belanceta, kako bi se ispitala mogućnost njegove zamene primenom tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta.



Slika 7.8. Raspodela veličina čestica proteina belanceta pretretiranih termičkim i ultrazvučnim pretretmanom u kupatilu, UZK-40kHz (umetnuti dijagram) i ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz u funkciji vremena pretretmana

Analiza raspodele veličine čestica izvedena je u cilju određivanja razlika u veličini čestica i postojanja eventualnih proteinskih agregata koji bi uticali na njihova funkcionalna svojstva, i to u najvećem stepenu na rastvorljivost.

Ako se analizira kriva koja predstavlja netretirano belance (kontrola), uočava se bimodalna raspodela veličine čestica, sa pikom u rasponu od 300-600 nm koji ima maksimum na $368,4 \pm 10,51$ i manjim pikom od 0,5-1,1 nm. Na osnovu vrednosti parametra

($0,521 \pm 0,011$) koji daje informaciju o širini ukupne distribucije veličine čestica (PdI), zaključuje se da kontrolni uzorak ima široku raspodelu veličina. Pretretman UZS-20 kHz prouzrokovao je pomeranje ka manjim prečnicima čestica i uticao je na smanjenje polidisperznog indeksa (PdI). Prosečna veličina čestica se smanjivala sa povećanjem vremena pretretmana do 15 min, nakon čega je došlo do blagog porasta veličine čestica. Najmanje čestice (od 368,4 do 68,4 nm) dobijene su nakon 15 min tretmana UZS-20kHz, što je u saglasnosti sa uočenim povećanjem rastvorljivosti u tom slučaju (Slika 7.1c). Zapravo, ultrazvučni talasi doveli su do razbijanja proteinskih granula i agregata na manje, čime je rastvorljivost povećana. Strukturne promene unutar molekula proteina belanceta mogu se dovesti u vezu sa delimičnim raskidanjem intermolekulskih hidrofobnih interakcija, pre nego peptidnih ili disulfidnih veza. Sa povećanjem vremena pretretmana, dolazi do smanjenja veličine čestica i povećanja slobodne površine molekula što se pripisuje efektu kavitacije, koja ne samo da utiče na razaranje agregata, nego i na redukciju manjih čestica raskidajući Van der Waals-ove sile. Raspodela je sužena što je potvrđeno i smanjenjem vrednosti PdI tokom vremena pretretmana (Tabela 7.1). Nakon 20 min pretretmana UZS-20kHz uočena je, ponovo, bimodalna raspodela veličina čestica, sa karakterističnim pikom na $260,6 \pm 1,67$ nm i manjim pikom na 68,4 nm. Prema tome, može se reći da je došlo do obrazovanja populacije većih čestica i formiranja agregata, te se sa pravom može tvrditi da nakon 20 min dolazi do neumerene denaturacije proteina belanceta kojima je povećana sposobnost ka nasumičnom međusobnom agregiranju. Ovi rezultati su u saglasnosti sa sadržajem sulfhidrilnih grupa (Slika 7.4).

Tabela 7.1. Veličina čestica i polidisperzni indeks (PdI) proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnom sondom frekvence $20 \pm 0,2$ kHz tokom 2, 5, 10, 15 i 20 min

Ultrazvučna sonda frekvence 20 kHz	Veličina čestica, nm	PdI
kontrola	$368,4 \pm 10,51$	$0,521 \pm 0,011$
2 min	$268,9 \pm 4,59^b$	$0,494 \pm 0,002^a$
5 min	$222,3 \pm 3,52^b$	$0,415 \pm 0,020^a$
10 min	$217,1 \pm 1,77^b$	$0,412 \pm 0,060^a$
15 min	$68,4 \pm 5,22^b$	$0,427 \pm 0,025^a$
20 min	$260,6 \pm 1,67^b$	$0,345 \pm 0,050^b$

^a statistički nije značajna razlika u poređenju sa kontrolom ($p > 0,05$)

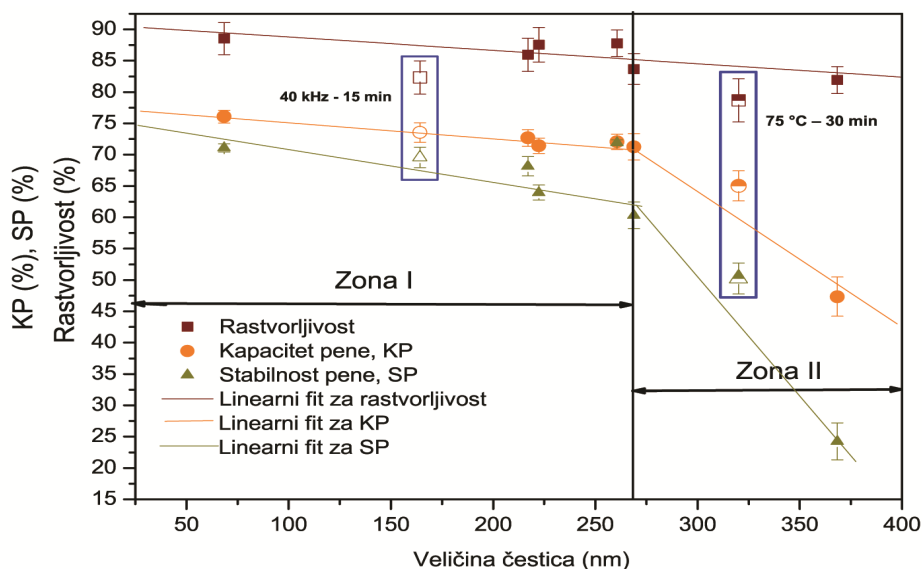
^b statistički značajna razlika u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$)

Rezultati prezentovani u okviru ovog istraživanja su u saglasnosti sa rezultatima Osalavan (O'Sullivan) i sar. (2016) koji su ustanovili značajno smanjenje veličine čestica nakon soniciranja nekoliko biljnih i životinjskih proteina, naglašavajući da je došlo do raskidanja nekovalentnih veza (elektrostatičke i hidrofobne interakcije) koje su odgovorne za održavanje proteinskih agregata u rastvoru [160]. Li i sar. (2014) su, takođe, konstatovali smanjenje čestica proteina pilećeg mesa nakon soniciranja, navodeći da su smicajne sile izazvane kavitacijom odgovorne za ovaj fenomen [368]. Nasuprot rezultatima ostvarenim u okviru ove teze, Arzeni i sar. (2012) su utvrdili da dolazi do povećanja veličine čestica proteina belanceta nakon ultrazvučnog pretretmana i ono je pripisano temperaturnom efektu nastalom tokom soniciranja [162]. Objašnjenje se može potražiti u činjenici da su oni izvodili pretretman bez kontrole temperature (dostizala i do 49 °C), dok su rezultati u okviru ove teze dobijeni pri termički kontrolisanim uslovima ultrazvučnog pretretmana (25 °C).

Na Slici 7.8 (umetnuti dijagram) prikazani su rezultati raspodele veličine čestica termički pretretiranih proteina belanceta i 15 min pretretiranih u ultrazvučnom kupatilu, UZK-40kHz, u poređenju sa 15 min pretretiranih sondom, UZS-20kHz. Može se zaključiti da oba pretretmana dovode do značajnog smanjenja ($p < 0,05$) veličine čestica, ali ne u tolikoj meri kao pretretman UZS-20kHz. Kao što se vidi, vrsta pretretmana ima itekako uticaj na veličinu čestica. Primenom konvencionalnog termičkog pretretmana (na 75 °C tokom 30 min) uočen je pik na 320,1 nm i široka raspodela veličina čestica, dok su za oba ultrazvučna pretretmana vrednosti glavnih pikova bile manje i iznosile su 68,4 nm i 164,2 nm za pretretman UZS-20kHz i UZK-40kHz, redom. Tretmanom UZK-40kHz došlo je do značajnog ($p < 0,05$) smanjenja veličine čestica, ali ne u tolikoj meri kao kod UZS-20kHz. Ako se uzme u obzir različita konstrukcija ova dva ultrazvučna uređaja, može se reći da je kod ultrazvučnog kupatila veća emitujuća površina sa koje se emituju mehaničke vibracije ultrazvučnih talasa, ali one nisu dovoljno jakog intenziteta kao kod delovanja sonde, koja je direktno uronjena u rastvor. Kod pretretmana UZK-40kHz verovatno je izraženiji uticaj turbulencije i smicajnih sila, pa ne dolazi do formiranja zona sa visokim pritiskom koji uzrokuje imploziju mehurića (kavitacija), što je primećeno kod UZS-20kHz.

Budući da je pokazano da postoji značajna razlika u veličini čestica nakon primene različitih pretretmana proteina belanceta, u sledećoj fazi ispitavanja želelo se utvrditi da li

postoji neka korelacija između veličine čestica i funkcionalnih svojstava. Analize su odrađene za pretretman UZS-20kHz u vremenu, zatim za usvojeno optimalno vreme pretretmana UZK-40kHz (15 min), kao i za termički pretretman. Na Slici 7.9. dat je grafički prikaz zavisnosti rastvorljivosti, kapaciteta pene i stabilnosti pene u funkciji veličine čestica.

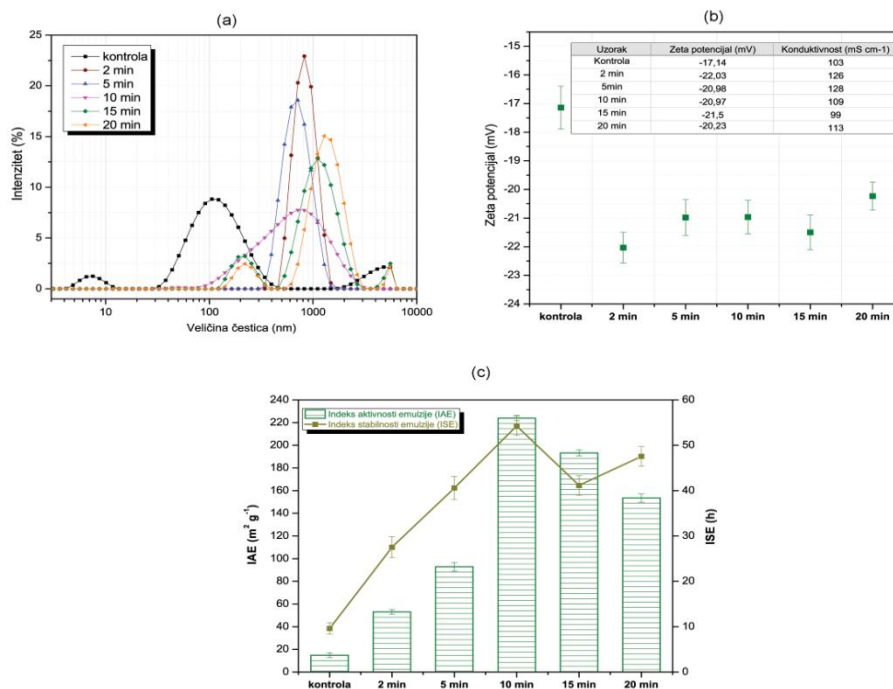


Slika 7.9. Korelacija kapaciteta pene, stabilnosti pene, rastvorljivosti i veličine čestica proteina belanceta pretretiranih učtrazvučnom sondom frekvence 20 kHz

Analizom rezultata, može se reći da postoji gotovo linearna zavisnost rastvorljivosti sa smanjenjem veličine čestica proteina, odnosno rastvorljivost se linearno smanjuje sa povećanjem čestica sugerišući značajnu ulogu specifične slobodne površine proteina na rastvorljivost. Smanjenje veličine čestica uticalo je na povećanje specifične slobodne površine, a samim tim i interakcija između molekula proteina i molekula vode, koje su rezultirale povećanjem rastvorljivosti. Što se tiče kapaciteta pene i stabilnosti pene, uočene su dve jasno definisane zone razdvojene granicom na 260 nm koja predstavlja kritičnu veličinu čestica. U prvoj zoni se nalaze čestice sa veličinom od 68,4 do 260,6 nm i unutar ove zone, vrednosti kapaciteta pene i stabilnosti pene prate linearan trend sa veoma malim promenama svojstava penjenja. U drugoj zoni su čestice sa veličinom u intervalu od 260 do 370 nm i ovde je zabeležen porast kapaciteta pene i stabilnosti pene sa smanjenjem veličine čestica od 370 ka 260 nm. Interesantno da vrednosti kapaciteta pene i stabilnosti pene za termički i UZK-40kHz pretretman su veoma bliske predviđenim vrednostima za tu veličinu

čestica sa UZS-20kHz dobijenim nakon linearizacije vrednosti, pa se može zaključiti da vrsta pretretmana nije presudna za dobru korelaciju između veličine čestica i svojstava penjenja različito pretretiranih proteina belanceta. Naime, izgleda da su svojstva proteina poput penjenja u velikoj meri određena veličinom čestica i slobodnom površinom. Nasuprot dobrom slaganju između kapaciteta pene i stabilnosti pene sa veličinom čestica, rastvorljivost je u znatno manjoj korelaciji sa veličinom čestica, što se vidi na osnovu toga što termički i UZK-40kHz pretretman proteina belanceta dovode do manje rastvorljivosti za istu veličinu čestica (zaokruženi simboli na slici) u poređenju sa pretretmanom sondom UZS-20kHz. Očigledno da, u slučaju rastvorljivosti, i neki drugi parametri imaju važnu ulogu, pored veličine čestice. Na primer, na rastvorljivost mogu da utiču različiti mehanizmi denaturacije proteina izazvane termičkim i ultrazvučnim pretretmanom, što je potvrđeno promenom sekundarne strukture proteina (Slika 7.13). U svakom slučaju, svi eksperimentalni setovi podataka ukazuju na to da veličina čestica bitno utiče na funkcionalna svojstva i da ne treba biti zanemarena.

Međusobna zavisnost između indeksa aktivnosti emuzije, *IAE* i indeksa stabilnosti emulzije, *ISE* i veličine čestica je, takođe, potvrđena i ustanovljeno je da sa smanjenjem čestica dolazi do poboljšanja emulgujućih svojstava za pretretman UZS-20kHz, ali zavisnost nije linearna (rezultati nisu prikazani). Vrednosti koeficijenata linearnosti iznosile su 0,621 i 0,309 za *IAE* i *ISE*, redom. Nedefinisana korelacija između veličine čestica, kao i zeta potencijala, sa emulgujućim svojstvima može biti posledica kompleksne smeše proteina belanceta. Eksperimenti su izvedeni sa nativnim proteinima belanceta koji se sastoji od više različitih proteinskih frakcija, a ne samo sa jednom izolovanom i prečišćenom proteinskom frakcijom, što je čest slučaj u literaturi. U cilju pronalaženja objašnjenja, urađen je set eksperimenata i sa prečišćenim model proteinom, ovalbuminom, koji je u najvećem procentu prisutan u belancetu. Ovalbumin je pretretiran ultrazvučnom sondom, UZS-20kHz, i ispitan je uticaj vremena pretretmana na raspodelu veličina čestica, zeta potencijal i emulgujuća svojstva. Rezultati su prikazani na Slici 7.10.



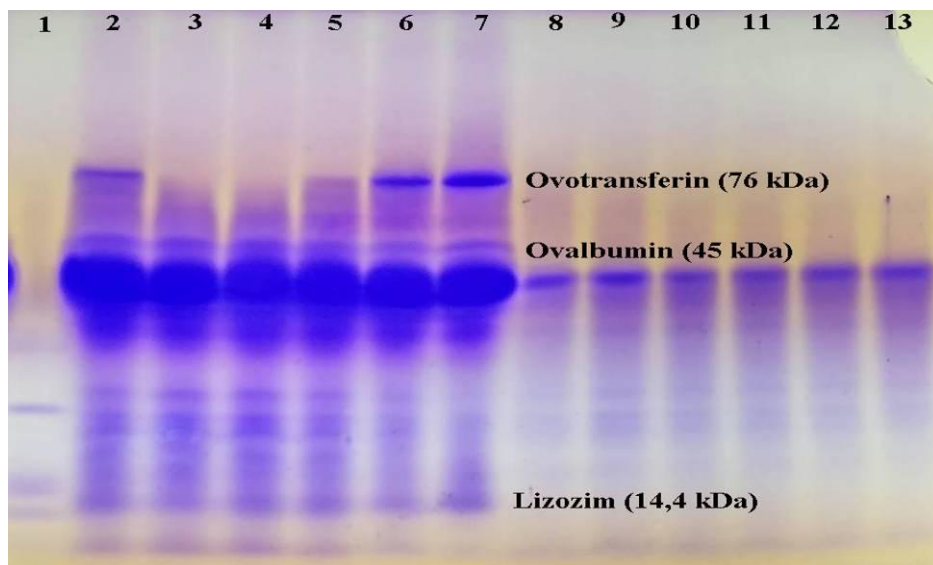
Slika 7.10. Raspodela veličine čestica (a), zeta potencijal (b) i emulgujuća svojstva (c) 2%-nog vodenog rastvora ovalbumina pretretiranog ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz u funkciji vremena pretretmana

Kako se može uočiti na dijagramu, trend zavisnosti ispitanih veličina od vremena je jako sličan trendu dobijenom sa smešom proteina belanceta. Tačnije, veličina čestica model proteina ovalbumina se smanjuje sa povećanjem vremena pretretmana UZS-20kHz i najmanje čestice dobijene su nakon 10 min pretretmana. Nakon ovog vremena, došlo je do povećanja veličine čestice i formiranja bimodalne raspodele veličine čestica sa karakterističnim pikom na 1033 nm nakon 15 min pretretmana i 1090 nm nakon 20 min pretretmana, kao i manjim pikovima na 210 i 1450 nm posle soniciranja u trajanju od 15 i 20 min, redom. Rezultati emulgujućih svojstava su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim sa smešom proteina belanceta sa izuzetkom optimalnog vremena pretretmana. Primećen je trend rasta *IAE* i *ISE* sa vremenom pretretmana i najveće vrednosti postignute su nakon 10 min soniciranja, nakon čega je usledio neznatan pad. Vrednosti zeta potencijala su potvrdile prisustvo negativno naelektrisanih aminokiselinskih ostataka i najveća stabilnost ostvarena je nakon 15 min pretretmana UZS-20kHz, što je, takođe, u skladu sa rezultatima dobijenim sa smešom proteina belanceta. Međutim, i dalje nije ustanovljena korelacija između *IAE* i

ISE sa veličinom čestica i zeta potencijalom, navodeći na zaključak da neki drugi faktori na intramolekulskom nivou imaju ključnu ulogu u tumačenju ove pojave, kao što su promene u veličini molekula usled raskidanja peptidnih veza i/ili promene unutar sekundarne i tercijarne strukture proteina belanceta. Naime, u nekim slučajevima u literaturi je pokazano da ultrazvuk može da prouzrokuje raskidanje peptidnih veza u molekulu proteina i dovede do oslobađanja manjih peptidnih lanaca.

Da bi se utvrdio uticaj vremena tretiranja sondom UZS-20kHz na molekulsku masu proteina belanceta kao i model proteina ovalbumina, SDS-PAGE elektroforeza je urađena i rezultati su predstavljeni na Slici 7.11. Upoređujući rezultate ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta sa kontrolom (bez pretretmana) jasno se vidi da je ultrazvuk prouzrokovao značajne promene u profilu proteina prisutnih u belancetu, a te promene su najizraženije nakon 5, 10 i 15 min soniciranja. Naime, smanjuje se intenzitet trake koja potiče od ovotransferina, ali se ne mogu objasniti uzroci ovog smanjenja na osnovu elektroforegrama. Između ostalog, produženo dejstvo sondom UZS-20kHz, dovelo je do formiranja agregata sa molekulskom masom oko 75 kDa. Kada su u pitanju rezultati dobijeni za model protein ovalbumin, nisu zapažene značajne promene nakon pretretmana sondom UZS-20kHz u odnosu na kontrolni netretirani uzorak. Na osnovu ovih analiza, može se reći da je pretretman sondom UZS-20kHz izazvao promene na proteinima čija je molekulska masa veća od molekulske mase ovalbumina (46 kDa). Sa dijagrama je jasno vidi da je to ovotransferin.

Može se pretpostaviti da će ovakav profil proteina uticati na poboljšanje enzimske hidrolize, što je ispitano u daljem toku ovog rada.



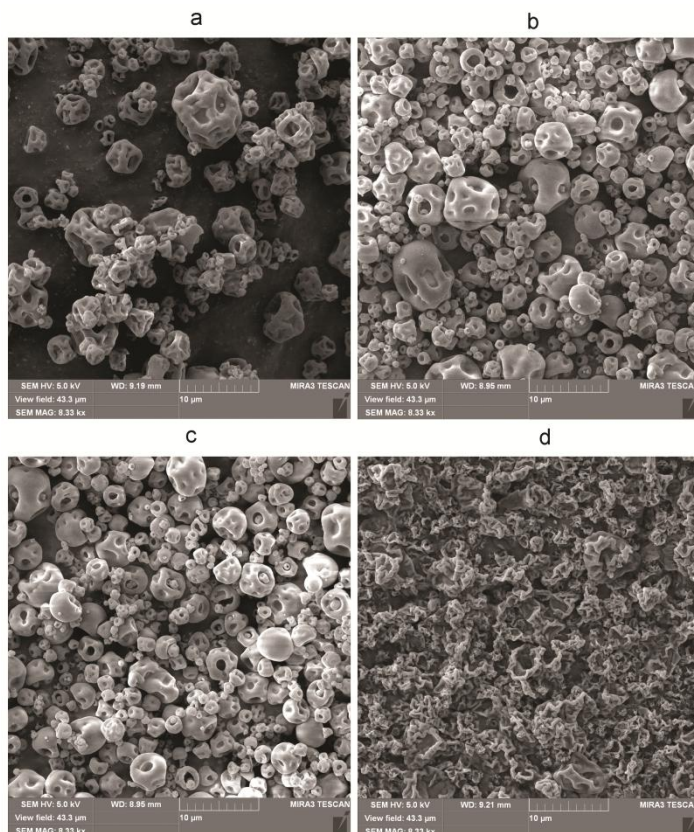
Slika 7.11. Promena sastava proteinskih frakcija proteina belanceta i model proteina ovalbumina nakon pretretmana ultrazvučnom sondom frekvence $20 \text{ kHz} \pm 0.2 \text{ kHz}$: (1) markeri, (2) proteini belanceta pretretirani UZS-20kHz 2 min, (3) proteini belanceta pretretirani UZS-20kHz 5 min, (4) proteini belanceta pretretirani UZS-20kHz 10 min, (5) proteini belanceta pretretirani UZS-20kHz 15 min, (6) proteini belanceta pretretirani UZS-20kHz 20 min, (7) netretirano belance (kontrola), (8) netretirani ovalbumin, (9) ovalbumin pretretiran UZS-20kHz 2 min, (10) ovalbumin pretretiran UZS-20kHz 5 min, (11) ovalbumin pretretiran UZS-20kHz 10 min, (12) ovalbumin pretretiran UZS-20kHz 15 min, (13) ovalbumin pretretiran UZS-20kHz 20 min

Ovi rezultati nisu u saglasnosti sa rezultatima Galserena i sar. (2007) koji su pokazali da ne dolazi do promene molekulske mase ultrazvučno pretretiranog govedjeg seruma albumina (15 min, 20 kHz, $\sim 20 \text{ W cm}^{-1}$) [156]. Đanđin i sar. (2014) su, takođe, zaključili da ultrazvučni pretretman ne dovodi do promene molekulske mase koncentrata proteina mleka (2 min, 12,5 W, snaga 50%) [151]. Rezultati Jambrak i sar. (2014) potvrdili su da dolazi do redukcije molekulske mase izolata i koncentrata surutke nakon ultrazvučnog pretretmana (15 min, 20 kHz, $\sim 48 \text{ W cm}^{-1}$) što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u okviru ove disertacije [155]. Tumačenjem ovih rezultata, može se zaključiti da intenzitet ultrazvuka figuriše kao bitna veličina, jer pri manjim intenzitetima ($\sim 20 \text{ W cm}^{-1}$ i 12,5 W) očigledno ne dolazi do promene molekulske mase proteina, dok veći intenzitet prouzrokuje kavitacioni efekat koji se manifestuje u jačim smicajnim silama i turbulenciji, oslobađanju slobodnih

radikala, koji napadaju molekul proteina, i na taj način dovodi do smanjenja molekulske mase proteina.

7.4. FE-SEM ANALIZA

Morfologija čestica osušenih, različito pretretiranih proteina belanceta određena je primenom tehnike skenirajuće elektronske mikroskopije sa emisijom polja opisanoj u odeljku 6.3.18.1. FE-SEM mikrografije prikazane su na Slici 7.12.



Slika 7.12. FE-SEM mikrografije (uvećanje $\times 8,33$ k, razmera = $10 \mu\text{m}$) netretiranih proteina belanceta (a), proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz 15 min (b), ultrazvučnim kupatilom frekvence 40 kHz 15 min i termičkim tretmanom na $75 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 min (d)

U zavisnosti od primenjenog pretretmana, lako se uočavaju drastične promene površinske morfologije različito pretretiranih proteina belanceta. Površina ultrazvučno pretretiranih čestica je glatka, ali je uočeno prisustvo određenih šupljina unutar same površine. Prisustvo konkavnih šupljina može biti posledica naglog isparavanja tečnosti

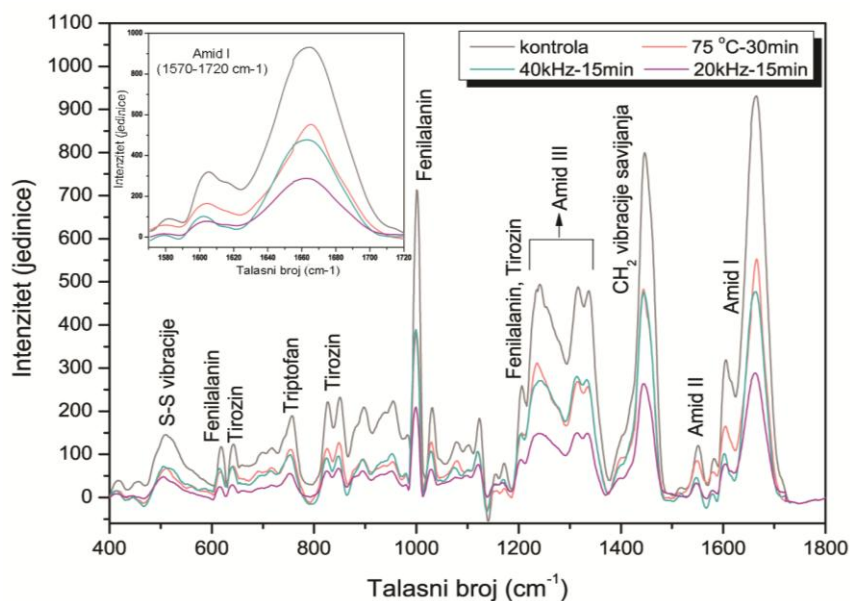
tokom procesa sušenja [369]. Ove šupljine su zapažene i kod netretiranih čestica (kontrola) koje su samo prošle proces sušenja. Generalno, može se reći da je površina većine čestica nakon pretretmana sondom UZS-20kHz sfernog oblika sa primetnim udubljenjima, ali postoje i čestice koje imaju glatku površinu bez ikakvih pukotina (Slika 7.12b). Takođe, čestice dobijene nakon pretretmana UZS-20kHz su uniformnije i manje, u poređenju sa česticima dobijenim nakon termičkog pretretmana i tretmana UZK-40kHz. Izmereni srednji prečnik čestica bio je u opsegu od 1 do 6 μ m, što je znatno manje u odnosu na ostala dva pretretmana. Ova činjenica može potvrditi tezu da pretretman UZS-20kHz intenzivnije utiče na narušavanje agregata čestica, usled učinkovitijeg dejstva ultrazvučne sonde urenjene direktno u rastvor supstrata. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa raspodelom veličina čestica, mada je merenje veličina čestica vršeno sa znatno većim brojem čestica prisutnih u rastvoru, dok se FE-SEM analiza radi sa mnogo manjom količinom sprasenog uzorka i ne može se smatrati pouzdanom tehnikom za određivanje veličine čestica u uzorku [370]. Ovako dobije vrednosti veličine čestica mogu se smatrati zadovoljavajućim, jer je poznato da velike čestice utiču na promenu teksture prehrambenih proizvoda koja utiče na malu rastvorljivost krajnjeg proizvoda.

Za razliku od uzoraka koji su bili izloženi dejstvu ultrazvučnih talasa, termički pretretman uticao je na formiranje potpuno drugačije morfologije čestica. Uočene su veće čestice, sunderaste strukture, sa grubljom površinom i poroznom strukturom, a primećeno je i postojanje velikih proteinskih agregata (Slika 7.12d). Može se reći da površina čestica, naizgled, podseća na skup povezanih gradivnih domena sastavljenih od diskretnih entiteta, sa nepravilnim šupljinama i porama. Uniformnost čestica je znatno manja u poređenju sa mikrografijama dobijenim nakon primene oba ultrazvučna pretretmana.

Na osnovu do sada pokazanog, oba ultrazvučna pretretmana dovela su do promene morfologije osušenih čestica proteina belanceta na drugačiji način od konvencionalnog i u literaturi često korišćenog, termičkog pretretmana, te se mogu smatrati adekvatnim izborom za unapređenje funkcionalnosti proteina belanceta. Ovi rezultati su poslužili za dalja ispitivanja koja su vodila ka razvoju i primeni tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta za dobijanje osušenih proteina belanceta kao finalnih proizvoda sa željenim funkcionalnim svojstvima (odjeljak 7.11.).

7.5. STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA

Ispitivanjem uticaja dejstva različitih pretretmana na površinske i morfološke karakteristike proteina belanceta delimično su objašnjena i dokazana njihova unapređena funkcionalna svojstva. Kako bi se u potpunosti objasnio ovaj fenomen, bilo je neophodno uraditi analize koje bi dale informacije o eventualnim promenama nastalim unutar sekundarne strukture proteina. Metoda Ramanove spektroskopije izabrana je kao pogodna za detekciju strukturnih promena i rezultati su prikazani na Slici 7.13 i u Tabeli 7.2.



Slika 7.13. Ramanov spektar ($400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$) netretiranih i različito pretretiranih proteina belanceta. Spektri su korigovani uklanjanjem šumova pomoću OriginPro9.0 softverskog paketa

Tumačenja glavnih traka koje karakterišu Ramanovu spektroskopiju urađena su korišćenjem podataka objavljenih u okviru istraživanja iz literature [371-373]. Uočeno je prisustvo Amida I na talasnim dužinama od $1570\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$, dok je karakteristična traka za Amid II detektovana na 1555 cm^{-1} . Region koji karakterišu S-S vibracije istežanja, koje su posledica prisustva aminokiselinskih ostataka sa sumporom u bočnom nizu, uočen je na talasnim dužinama od $501\text{-}511\text{ cm}^{-1}$. Još jedan jako bitan region, odgovoran za promene nastale unutar sekundarne strukture, je region sa C-H vezama alifatičnih ostataka čije je prisustvo zabeleženo pojavom pika na 1420 cm^{-1} . Takođe, analizom Ramanovog spektra, detektovano je i prisustvo jako izraženih pikova na talasnim dužinama od $1226\text{-}1338\text{ cm}^{-1}$

koji se mogu pripisati Amidu III. Preliminarni rezultati spektra ukazuju na to da najizraženije trake potiču od proteina koji je u najvećem procentu prisutan u belancetu i čiju strukturu čine α -zavojnica i β -naborani list.

Dakle, potrebno je naglasiti da su velike promene uočene na talasnim dužinama koje odgovaraju Amidu I ($1570-1720\text{ cm}^{-1}$) i to za sva tri ispitana pretretmana u odnosu na kontrolni uzorak. Takođe, na osnovu dobijenih spektara, može se zaključiti da je došlo do značajnog smanjenja intenziteta pikova unutar Amid III regiona za sva tri ispitana pretretmana. Najizraženije promene u oba regiona uočene su nakon pretretmana UZS-20kHz tokom 15 min. Zabeležene promene su u skladu sa literaturno dostupnim podacima koji tvrde da termičko procesiranje proteina belanceta dovodi do strukturnih promena i formiranja stabilne strukture β -naboranog lista [371]. Isto tako, autori navode da se obrazovanje intermolekulskih strukturnih domena, izazvanih denaturacijom i agregacijom termički tretiranog belanceta, može smatrati glavnim razlogom za promenu strukture na molekulskom nivou [371]. Mine i sar. (1990) ističu da su strukture promene termički denaturisanih proteina belanceta posledica povećanja udela β -naboranog lista i smanjenja udela spiralne strukture [374].

Kako bi se bolje objasnili dobijeni spektri, vrednosti intenziteta pikova Amid I regiona normalizovani su u odnosu na pik fenilalanina (1004 cm^{-1}) i rezultati normalizacije predstavljeni su u Tabeli 7.2.

Tabela 7.2. Normalizovane vrednosti intenziteta Ramanovih traka unutar Amid I regiona

Pretretman	Normalizovane vrednosti intenziteta* Ramanovih pikova			
	Tirozin ($640,6\text{ cm}^{-1}$)	Fenilalanin ($618,4\text{ cm}^{-1}$)	S-S vibracije ($500-511\text{ cm}^{-1}$)	CH_2 vibracije ($1439,4-1447\text{ cm}^{-1}$)
kontrola	$0,040\pm 0,021$	$0,044\pm 0,002$	$0,039\pm 0,001$	$0,099\pm 0,001$
20kHz-15min	$0,189\pm 0,055$	$0,128\pm 0,059$	$0,134\pm 0,054$	$0,213\pm 0,051$
40kHz-15min	$0,102\pm 0,081$	$0,125\pm 0,097$	$0,105\pm 0,079$	$0,171\pm 0,086$
75 °C-30min	$0,123\pm 0,097$	$0,105\pm 0,081$	$0,124\pm 0,089$	$0,188\pm 0,101$

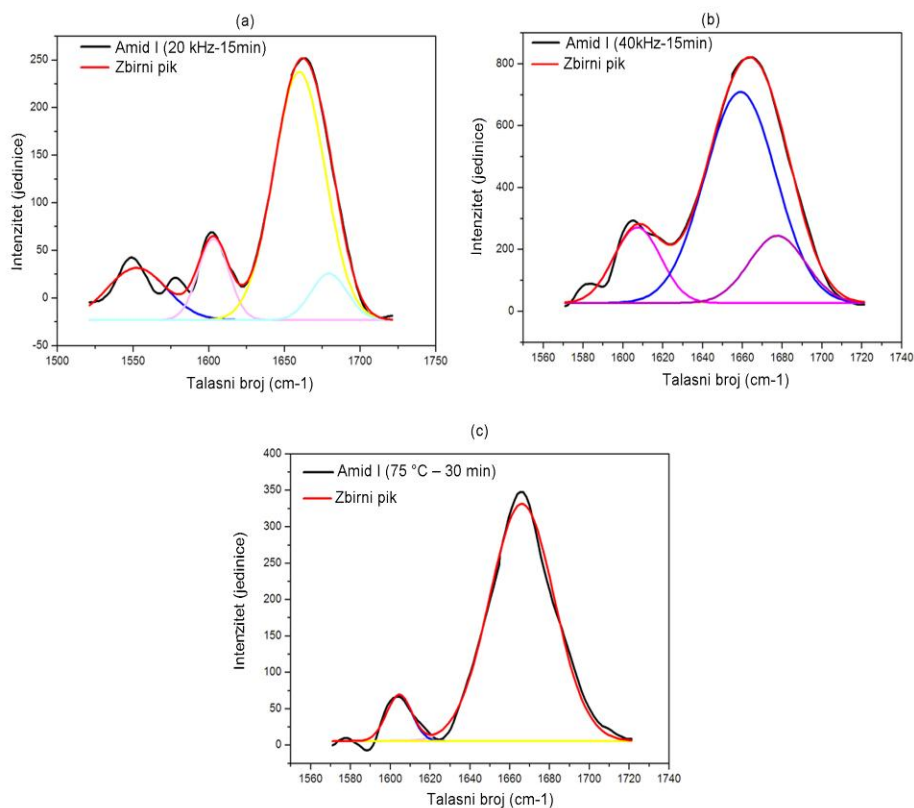
*Normalizacija je urađena u odnosu na pik fenilalanina na 1004 cm^{-1}

Ultrazvučno pretretirani proteini belanceta pokazali su drastično smanjenja intenziteta pika u opsegu talasnih brojeva od $1439-1447\text{ cm}^{-1}$ (Slika 7.13). Normalizovane vrednosti intenziteta iznosile su $0,213\pm 0,051$ i $0,171\pm 0,086$ za pretretman UZS-20kHz i UZK-40kHz,

redom. Oba pretretmana pokazala su statistički značajne ($p < 0,05$) promene sekundarne strukture u poređenju sa netretiranim proteinima belanceta ($0,099 \pm 0,001$). Važno je istaći da je i termički pretretman doveo do smanjenja intenziteta pomenutog pika, koje je bilo čak i veće u odnosu na povećanje ostvareno nakon primena UZK-40kHz (Slika 7.13). Na osnovu dostupnih literaturnih podataka, može se reći da su nastale promene unutar Amida I posledica deformacionih promena CH_2 grupa koje ukazuju na to da je došlo do promena uslova sredine oko alifatičnih bočnih lanaca proteina nakon zagrevanja ili sonikacije [186,375].

Prilikom analize strukture proteina, obrazovanje disulfidnih veza je od izuzetne važnosti i promene nastale unutar ovog regiona ($500\text{-}511\text{ cm}^{-1}$) su zabeležene na dobijenim Raman spektrima. Na spektru se jasno vidi da je došlo do promene intenziteta pika S-S vibracija nakon primene sva tri pretretmana, s tim što je najuticajniji bio pretretman sondom, UZS-20 kHz, dok su vrednosti dobijene za termički pretretman i tretman kuptailom, UZK-40kHz, veoma bliske. Konformacione promene prikazane na Raman spektrima potvrdile su da je ultrazvučni pretretman uticao na promene unutar disulfidnog regiona, čime je potvrđen i objašnjen povećan sadržaj sulfhidrilnih grupa nakon ultrazvučnih pretretmana (Slika 7.4).

Kako bi se dodatno proverile navedene strukturne promene izazvane ultrazvučnim i termičkim pretremanom, urađena je dekonvulacija Amid I regiona i rezultati su prikazani na Slici 7.14.



Slika 7.14. Spektri Amid I regiona dobijeni nakon dekonvolucije svih Raman spektara prikupljenih nakon pretretmana proteina belanceta ultrazvučnom sondom frekvence 20kHz 15 min (a), ultrazvučnim kupatilom frekvence 40 kHz 15 min (b) i termičkim tretmanom na 75 °C 30 min (c)

Detaljnijom analizom Amid I regiona svih testiranih uzoraka, utvrđeno je postojanje malog pika na 1575 cm^{-1} nakon 15 min pretretmana sondom UZS-20kHz. Pojava ovog pika može se objasniti većim prisustvom histidinskih ostataka nastalih dejstvom UZS-20kHz [376]. Karakterističan pik na 1575 cm^{-1} nije detektovan kod UZK-40kHz i termičkog pretretmana. Dekonvolucijom Amid I regiona za pretretman UZK-40kHz detektovani su pikovi na 1604 cm^{-1} i 1618 cm^{-1} koji su verovatno posledica prisustva aromatičnih aminokiselinskih ostataka i njihovih oscilatornih kretanja [377]. Može se primetiti da je pik na 1604 cm^{-1} veoma izražen i da ima veći intenzitet u odnosu na blago pomeren položaj istog pika, uočen kod termičkog pretretmana (1605 cm^{-1}) i pretretmana UZS-20kHz (1600 cm^{-1}). Posmatrajući Amid I region, može se zaključiti da je ultrazvučni pretretman doveo do smanjenja intenziteta pika na 1670 cm^{-1} , što se može objasniti

pretpostavkom koja ukazuje na manji udeo α -zavojnice nakon primene oba ultrazvučna pretretmana [375].

Sumiranjem svih prethodno iznesenih činjenica, zaključuje se da je pretretman UZS-20kHz imao efektivniji uticaj na promenu sekundarne strukture proteina belanceta, te se sa sigurnošću može tvrditi da su unapređena funkcionalna svojstva posledica promene sekundarne strukture proteina, kao i njihovih površinskih karakteristika.

7.6. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

Kako je bezbednost hrane jedan od najvažnijih zahteva koji se nameće proizvođačima, ispitivanje potencijala primene ultrazvuka visokog intenziteta, kao koraka pre enzimske hidrolize umesto tradicionalnog termičkog postupka, važno je sa aspekta smanjenja broja ili čak uništenja mikroorganizama. U Evropi proizvodi od jaja moraju ispuniti uslove propisane sve rigidnijim zahtevima za mikrobiološkom ispravnošću i bezbednošću (EU Regulation 2073/2005). U skladu sa tim uzorci ne smeju sadržati *Salmonella* sp. čak ni u tragovima i treba da sadrže manje od 2 log *Enterobacteriaceae* nakon primene odgovarajućeg pretretmana.

Ispitan je sadržaj ukupnog broja mikroorganizama, kao i stepen redukcije broja ćelija u fiziološkom rastvoru u kome su selektovani mikroorganizmi bili izloženi dejstvu prethodno pažljivo pasterizovanih proteina belanceta. Mikrobne kulture koje su se koristile u ovim ispitivanjima bile su: *Salmonella enteritidis* i *Enterobacteriaceae*. Na osnovu prethodnih istraživanja, usvojeno je optimalno vreme pretretmana i ono je za sva tri ultrazvučna tretmana iznosilo 15 min, te su mikrobiološke analize urađene sa ovim usvojenim uzorcima. Dobijeni rezultati su upoređeni sa kontrolnim uzorkom (netretiran), kao i sa termički pretretiranim uzorkom i prikazani su u Tabeli 7.3.

Tabela 7.3. Uticaj različitih pretretmana na ukupan broj mikroorganizama

Pretretman	Broj aerobnih bakterija koje formiraju kolonije					<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Salmonella</i> spp.
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}		
kontrola	327	31	3	-	-	-	-
	319	22	1	-	-	-	-
35kHz-15min	426 ^a	45 ^a	6 ^a	-	-	-	-
	405 ^a	41 ^a	4 ^a	-	-	-	-
40kHz-15min	337 ^a	35 ^a	4 ^a	-	-	-	-
	365 ^a	25 ^a	4 ^a	-	-	-	-
75 °C-30min	- ^b	- ^b	- ^b	-	-	-	-
20kHz-15min	34 ^b	6 ^b	- ^b	-	-	-	-
	23 ^b	4 ^b	- ^b	-	-	-	-

a statistički nije značajno u odnosu na kontrolu ($p > 0.05$)

b statistički značajno u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$)

kontrola - netretirano belance; 35kHz-15min - belance tretirano ultrazvučnim talasima frekvence 35kHz tokom 15 minuta; 40kHz-15 min - belance tretirano ultrazvučnim talasima frekvence 40kHz tokom 15 minuta; 20kHz-15min - belance tretirano ultrazvučnim talasima frekvence 20kHz tokom 15 minuta; 75 °C-30min - belance tretirano temperaturom od 75 °C tokom 30 minuta.

Upoređujući rezultate prikazane u Tabeli 7.3, može se konstatovati statistički značajno smanjenje ($p < 0,05$) broja aerobnih bakterija koje formiraju kolonije nakon termičkog pretretmana i pretretmana UZS-20kHz. Naime, u poređenju sa kontrolnim uzorkom, broj mikroorganizama je redukovan za 92% i 100% nakon primene pretretmana UZS-20kHz i termičkog pretretmana, redom. Primenom UZK-35kHz i UZK-40kHz nije zabeležen smanjen broj aerobnih bakterija. Prisustvo *Salmonella enteritidis* i *Enterobacteriaceae* nije detektovano ni u jednom uzorku.

Drastično smanjen broj aerobnih bakterija nakon pretretmana UZS-20kHz, u poređenju sa druga dva ultrazvučna pretretmana, može se objasniti učestalijom implozijom mehurića i intenzivnijom kavitacijom usled direktnog kontakta ispitivanog medijuma sa ultrazvučnom sondom. Nastali slobodni radikali (H i OH[•]) smatraju se odgovornim za inaktivaciju ćelijskog zida bakterija, dovodeći do oksidativnog stresa ćelije na sličan način kao hidroperoksid radikali [378]. Tretiranjem uzoraka u ultrazvučnom kupatilu, ne postoji direktan kontakt između uzorka i emitujuće površine ultrazvučnih talasa, pa se oni neravnomerno emituju unutar kupatila dovodeći do prigušivanja (atenuacije) amplitude talasa, odnosno slabljenja jačine ultrazvuka tokom vremena. Efekat kavitacije u ovom slučaju nije dovoljno izražen, te stoga nisu zabeleženi očekivani rezultati smanjenja broja aerobnih bakterija.

Postoje izvesne teškoće u poređenju dobijenih rezultata sa dostupnim literaturnim podacima. Razlog tome je što se često koriste različite metode, a i pri korišćenju iste metode, dobijeni rezultati se izražavaju u različitim jedinicama. Generalno, može se zaključiti da je pretretman UZS-20kHz dao pozitivan efekat sa aspekta mikrobiološke ispravnosti pretretiranih proteina belanceta i može se smatrati adekvatnom zamenom konvencionalnog termičkog pretretmana koji se najčešće koristi u praksi, uprkos brojnim nedostacima.

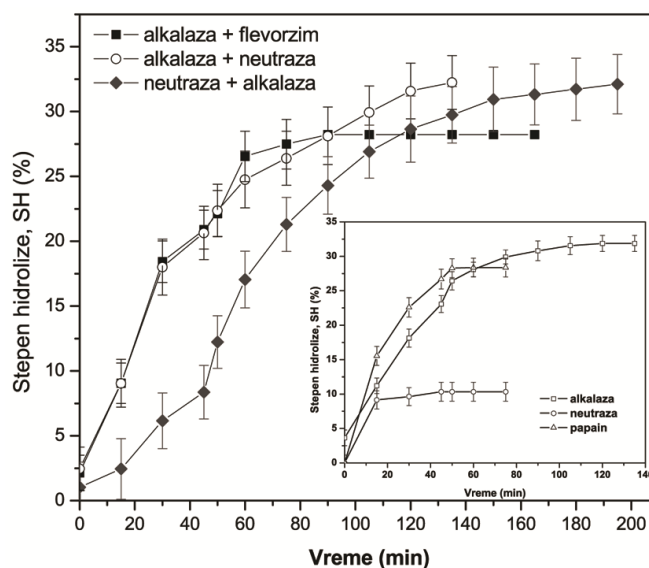
7.7. ENZIMSKA HIDROLIZA PROTEINA BELANCETA U ŠARŽNOM REAKTORSKOM SISTEMU

Osnovni cilj ove disertacije je da se doprinese razvoju enzimskog procesa hidrolize proteina belanceta i optimizaciji ultrazvučnog pretretmana kao adekvatnoj zameni za tradicionalni termički pretretman procesiranja proteina belanaca. Imajući ovo u vidu, naredna faza istraživanja posvećena je optimizaciji enzimske hidrolize proteina belanceta primenom različitih vrsta proteaza u jednostepenom i dvostepenom enzimskom postupku, kao i optimizaciji procesnih parametara i načinima izvođenja enzimske hidrolize ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta. U okviru ove faze istraživanja ispitana je primena različitih ultrazvučnih pretretmana, sa opsegom frekvenci od 20-40 kHz, na efikasnost enzimske hidrolize proteina belanceta. Varirani su uslovi izvođenja samog pretretmana kao što su: kalorimetrijska snaga ultrazvučnih talasa, frekvencija ultrazvučnih talasa, dužina trajanja pretretmana i radna temperatura. Takođe, određen je i kinetički model hidrolize proteina belanceta u šaržnom reaktoru, koji valjano opisuje tok enzimske reakcije i na osnovu koga je moguće predvideti stepene hidrolize i sastave hidrolizata u dužem vremenskom periodu.

7.7.1. Optimizacija procesa enzimske hidrolize proteina belanceta primenom različitih vrsta proteaza

U preliminarnim istraživanjima ispitan je uticaj vrste proteaze (endo- i egzopeptidaze) i načina izvođenja enzimskog postupka hidrolize proteina belanceta (jednostepena i dvostepena) na efikasnost reakcije hidrolize i funkcionalna svojstva dobijenih hidrolizata. Hidroliza je za svaki eksperiment izvedena pri usvojenim optimalnim uslovima za svaki enzim, datim u Tabeli 6.1. Pre enzimske hidrolize, proteini belanceta su pretretirani

ultrazvučnim talasima frekvence 40 kHz tokom 15 min i na temperaturi ultrazvučnog kupatila od 25 °C. Nakon pretretmana, uzorci su hidrolizovani korišćenjem različitih, komercijalno dostupnih proteaza (alkalaza, neutraza, papain i flevorzim) u okviru jednostepenog i dvostepenog enzimskog postupka. Grafičko poređenje eksperimentalnih krivih hidrolize dobijenih tokom jednostepene i dvostepene enzimske hidrolize proteina belanceta prikazano je na Slici 7.15.



Slika 7.15. Krive hidrolize ultrazvučno pretretiranih hidrolizata proteina belanceta dobijenih tokom jednostepene (umetnuta slika) i dvostepene enzimske hidrolize katalizovane različitim proteazama (Uslovi pretretmana: 40 kHz, 15 min, 25 °C)

Može se primetiti da početna brzina reakcije, kao i tok same hidrolize variraju u odnosu na specifičnost korišćene proteaze, afinitet supstrata prema enzimu i načinu izvođenja enzimskog postupka. Što se tiče jednostepene enzimske hidrolize, najveći stepeni hidrolize, *SH* ostvareni su nakon dejstva alkalaze (31,87%), zatim papaina (28,37%) i na kraju neutraze (10,34%). Ovi rezultati su bili očekivani zbog činjenice da je alkalaza endopeptidaza koja nasumično deluje na peptidne veze unutar molekula proteina belanceta dovodeći do stvaranja peptida male molekulske mase. Međutim, početna brzina reakcije hidrolize proteina belanceta katalizovane papainom je neznatno veća u poređenju sa brzinom reakcije katalizovane alkalazom. U ovom slučaju, došlo je do velike konverzije supstrata tokom prvih 30 min reakcije ($SH = 22,57\%$) nakon čega je zabeleženo malo

povećanje SH , a već nakon 50 min postignut je ravnotežni SH koji je označio kraj reakcije (28,37%). Reakcija hidrolize katalizovana alkalazom bila je postepena i bez naglih skokova, sve do 75 minuta ($SH = 29,89\%$), nakon čega je primećeno neznatno povećanje SH i u 90 min je postignuta ravnoteža (31,87%). Prilikom hidrolize proteina belanceta neutrazom, već nakon 15 min reakcije ostvaren je ravnotežni stepen hidrolize (10,34%) i uspostavljano je stacionarno stanje. Slični rezultati su objavljeni od strane drugih autora koji su ispitali uticaj različitih mikrobnih proteaza na efikasnost reakcije hidrolize proteina surutke i došli su do saznanja da su najmanji stepeni hidrolize dobijeni nakon hidrolize proteina surutke neutrazom, u poređenju sa alkalazom i flevorzimom, koji su uticali na dobijanje peptida sa kraćim aminokiselinskim lancima [379].

Dvostepena enzimaska hidroliza proteina sve više se nameće u savremenoj literaturi kao najefikasnije tehnološko rešenje za dobijanje hidrolizata tačno definisanih svojstava. Radi dobijanja peptida različitih dužina lanaca, dvostepena enzimaska hidroliza izvedena je kombinovanjem endo- i egzo-proteaza, a ispitan je i uticaj promene redosleda dodavanja proteaza. Analizom krivih hidrolize dobijenih nakon dvostepenog enzimskog postupka, može se konstatovati da su najveći stepeni hidrolize i početna brzina reakcije postignuti kombinacijom proteaze iz *Bacillus licheniformis* - alkalaza i proteaze iz *Bacillus amyloliquefaciens* - neutraza. Redosled dodavanja ova dva enzima nije značajno uticao na postignuti SH ($32,18 \pm 0,04\%$), ali su primećene značajne razlike u početnim brzinama reakcije. Dvostepena enzimaska hidroliza započeta alkalazom i naknadnim dodatkom neutraze, pokazala se kao značajno brža ($0,60 \Delta SH\% \text{ min}^{-1}$).

Iako je utvrđeno da se postižu nešto veći stepeni hidrolize u dvostepenom enzimskom procesu, jedan od ciljeva je bio da se utvrdi koji postupak i u kolikoj meri utiče na funkcionalna svojstva hidrolizata proteina belanceta pri datim uslovima hidrolize. Uporedo sa tokom hidrolize praćena je i promena funkcionalnosti dobijenih hidrolizata (Tabela 7.4). Kako su funkcionalna svojstva hidrolizata zavisna od SH , svi hidrolizati dobijeni tokom jednostepene i dvostepene enzimske hidrolize hidrolizovani su do istog SH koji je iznosio 27% i rezultati su dati u Tabeli 7.4.

Tabela 7.4. Funkcionalna svojstva hidrolizata proteina belanceta dobijenih tokom jednostepenog i dvostepenog enzimskog postupka primenom različitih proteaza

Parametri	Kontrola*	Alkalaza	Papain	Alkalaza + flevorzim	Alkalaza + neutraza
Stepen hidrolize, SH (%)	–	27	27	27	27
Kapacitet pene, KP (%)	75,12±1,01	73,55±1,21	74,75±1,11	75,96±1,09	77,48±1,16
Stabilnost pene, SP (%)	32,43±0,98	73,55±1,34	46,81±0,98	65,75±1,23	69,51±1,06
Svarljivost, (%)	69,29±1,56	79,17±1,67	90,72±1,93	79,3±1,50	79,83±1,27
Rastvorljivost na pH 6, (%)	70,69±1,23	89,27±2,19	95,41±2,34	100,00±0,01	77,43±1,38
Rastvorljivost na pH 8, (%)	81,85±2,12	87,34±2,94	100,00±0,02	97,73±1,67	81,19±1,29
Redujuća moć	0,046±0,002	0,105±0,011	0,080±0,006	0,062±0,003	0,068±0,001
Ukus	bez ukusa	slan i veoma gorak	veoma neprijatan	slan, ali nije gorak	slan i gorak

* netretirano belance

Uopšteno, može se zaključiti da je enzimska hidroliza ultrazvučno pretretiranih hidrolizata povoljno uticala na povećanje rastvorljivosti, svarljivosti, redukujuće moći i stabilnosti pene svih dobijenih hidrolizata. Hidrolizat dobijen pomoću alkalaze u jednostepenom enzimskom postupku je pokazao najveću redukujuću moć u poređenju sa drugim hidrolizatima, a u poređenju sa kontrolom, ostvareno je povećanje od 128%. Ovakav rezultat je pokazatelj da hidrolizat dobijen dejstvom alkalaze ima veliku sposobnost da donira elektron, a samim tim i izvesni potencijal antioksidativne aktivnosti. Rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima dobijenim od strane Pana (Pan) i sar. (2011) koji su utvrdili da hidrolizati proteina iz uljane repice dobijeni pomoću alkalaze pokazuju odličnu redukujuću moć [380].

Najveća rastvorljivost i svarljivost zabaležena je kod hidrolizata dobijenih nakon jednostepenog enzimskog postupka pomoću papaina. Ovakav rezultat može se pripisati smanjenju molekulske mase proteina belanceta i nastanku malih peptida sa hidrofilnim svojstvima koji su uticali na povećanje rastvorljivosti hidrolizata. Takođe, moguće da je povećana i fleksibilnost molekula, što je direktno uticalo na poboljšanje svojstva penjenja ultrazvučno pretretiranih hidrolizata dobijenih pomoću papaina. Naime, najveći kapacitet

pene dobijen je nakon dvostepene enzimске hidrolize katalizovane alkalazom i neutrazom, dok je nastabilnija pena dobijena nakon jednostepene enzimске hidrolize katalizovane alkalazom. Ostvareno je povećanje stabilnosti pene od 132,9% u odnosu na kontrolu (sirovo belance). Poznato je da stabilnost pene zavisi od jačine proteinskog filma koji se formira na granici faza voda/vazduh i njegove propustljivosti ka molekulima vazduha [1]. Tipična pena se sastoji od miliona mehurića inkapsuliranih pomoću proteinskog filma i odvojenih tankim kanalima ispunjenim vodom. Prema Belicu (Belitz) i sar. (2004) protein se tokom procesa stvaranja pene adsorbuje na površinu preko hidrofobnih regiona, pri čemu dolazi do njegovog parcijalnog „odmotavanja“, a ova adsorpcija dovodi do smanjena površinskog napona i olakšava formiranje pene [220]. Mehurići pene su stabilizovani duplim proteinskim slojem koji je odvojen kontinualnom fazom, tako da karakteristike ovog tankog filma određuju i samu stabilnost pene.

S tim u vezi, može se reći da je ultrazvučni pretretman izazvao promene fizičko-hemijskih svojstava proteina, utičući najpre na povećanje hidrofobnosti proteina (što je potvrđeno u prethodnom poglavlju), koja je u određenoj meri sačuvana i/ili čak povećana nakon dejstva različitih proteaza i na taj način unapredio svojstva penjenja istih. Takođe, pokazano je da osim primene ultrazvučnog pretretmana, veliki uticaj na funkcionalna svojstva ima odgovarajući izbor enzima. Na primer, hidrolizat sa najboljom svarljivošću je dobijen u reakciji hidrolize sa papainom, dok je hidrolizat sa najvećom rastvorljivošću na pH 6 i pH 8 dobijen tokom dvostepenog enzimskog postupka sa alkalazom i flevorzimom.

Rezultati ukazuju da enzimska hidroliza povećava svarljivost proteina belanceta u svim slučajevima što je od izuzetnog značaja. Naime, hidrolizati dobijeni sa papainom su skoro 100% svarljivi, što je od značaja za formulaciju napitaka i proteinskih suplemenata za sportiste, rekreativce i osobe sa poremećenim radom digestivnog trakta na specijalnom dijetetskom režimu ishrane. Poslednje navedeno, ali ne i najmanje važno, ispitano je svojstvo ukusa hidrolizata koje nije pokazalo zadovoljavajući rezultat, izuzev u kombinaciji enzima alkalaza + flevorzim, koji je bio manje gorak u odnosu na ostale hidrolizate. Egzopeptidaza iz *Aspergillus oryzae*, (flevorzim) se pokazala kao efikasna za smanjenje gorčine hidrolizata, prvenstveno zbog svoje specifičnosti, jer deluje na krajevima peptidnog lanca oslobađajući aminokiseline sa C-terminalnog kraja. Generalno, u poređenju sa jednostepenom enzimskom hidrolizom, dvostepeni enzimski postupak nije značajno

($p < 0,05$) uticao na poboljšanje funkcionalnih svojstava ultrazvučno pretretiranih hidrolizata, a tretmani sa egzopeptidazama su se pokazali praktičnim i efikasnim za regulisanje gorčine proteinskih hidrolizata

Konstatovano je da se ultrazvučni pretretman pokazao kao moguća opcija za poboljšanje funkcionalnosti hidrolizata proteina belanceta. Kako bi se njegov uticaj što bolje objasnio, neophodno je bilo sprovesti kompletnu optimizaciju pretretmana koja je podrazumevala ispitivanje frekvence ultrazvuka, dužine trajanja tretmana i temperature na funkcionalna i strukturna svojstva dobijenih hidrolizata. Na osnovu ovih preliminarnih rezultata, jednostepena hidroliza belanceta u šaržnom reaktoru sa mešanjem katalizovana alkalazom, usvojena je kao najefikasnija, te je u daljem eksperimentalnom radu ovog naučnog istraživanja korišćen jednostepeni postupak sa alkalazom.

7.8. UTICAJ ULTRAZVUČNOG PRETRETMANA NA ENZIMSKU HIDROLIZU PROTEINA BELANCETA

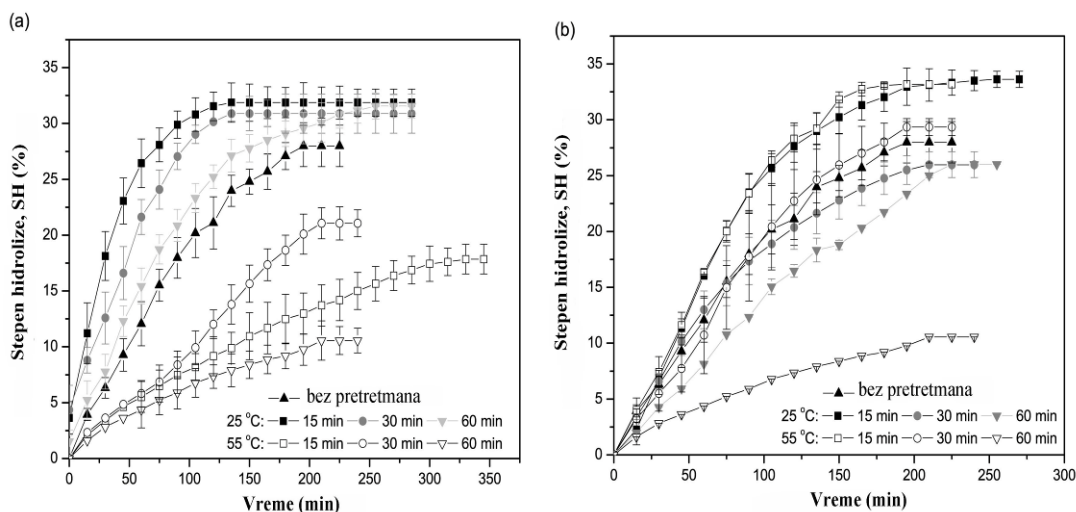
7.8.1. Optimizacija uslova izvođenja ultrazvučnog pretretmana

Zbog prisustva specifičnih inhibitora serinskih proteaza u nativnom belancetu (npr. ovomukoid) i slabe efikasnosti proteaza, neophodno je uvođenje nekog pretretmana pre enzimske hidrolize kako bi se povećala aktivnost korišćene proteaze. Uzorci proteina belanceta pretretirani su različitim ultrazvučnim tretmanima u cilju unapređenja enzimske hidrolize i postizanja većih stepena hidrolize (*SH*) prilikom dejstva alkalaze. Cilj je bio pronaći uslove pri kojima dolazi do ireverzibilne denaturacije inhibitora proteaza, ali u isto vreme, definisati uslove pretretmana koji neće dovesti do stvaranja nerastvornih proteinskih agregata ili precipitata koji se smatraju veoma lošim supstratima za efikasnu enzimsku hidrolizu.

Svi uzorci su tretirani ultrazvukom frekvence 35 i 40 kHz u trajanju od 15, 30 i 60 min (ultrazvučna kupatila) i ultrazvukom frekvence 20 kHz (ultrazvučna sonda) u trajanju od 2, 5, 10, 15 i 20 minuta. Reakcija hidrolize bila je katalizovana alkalazom i odvijala se uvek pod istim uslovima (pH 8, 50 °C) u reaktoru sa mešanjem, pri čemu je korišćena mehanička mešalica sa četiri propelera. Usled različite konstrukcije ultrazvučnih uređaja, tokom soniciranja UZS-20kHz temperatura se održavala konstantnom (25 ± 1 °C) proticanjem termostatisane vode kroz vodeni plašt reakcionog suda, dok je kod UZK-40 kHz i UZK-35

kHz bilo neophodno ispitati uticaj temperature destilovane vode unutar kupatila na sam proces enzimske hidrolize zbog nemogućnosti automatske kontrole temperature. Hidrolizati su pretretirani na dve različite temperature ($25 \pm 3,5$ °C i $55 \pm 3,5$ °C) tokom 15 min, 30 min i 60 min, a uticaj dužine pretretmana UZK-40 kHz i UZK-35 kHz i temperature vode unutar kupatila predstavljen je Slici 7.16.

Evidentno je da početna brzina enzimske reakcije, kao i sam njen dalji tok, značajno variraju u zavisnosti od vremena pretretmana, frekvence ultrazvučnih talasa i kalorimetrijske snage (Slika 7.16). Pretretman UZK-40kHz na nižoj temperaturi vode unutar kupatila (25 °C) unapredio je reakciju enzimske hidrolize proteina belanceta u svim ispitivanim vremenima pretretmana (Slika 7.16a). U ovom slučaju, vreme pretretmana nije mnogo uticalo na krajnji *SH* ($31,44 \pm 0,251\%$), ali je primećeno samnjenje početne brzine reakcije sa povećanjem vremena pretretmana. Jasna razlika u početnim brzinama reakcije sa vremenom pretretmana je dobijena i nakon pretretmana na temperaturi vode unutar kupatila od 55 °C, ali u poređenju sa kontrolnim uzorkom (netretiran), bolji rezultati su ostvareni primenom UZK-40kHz na temperaturi od 25 °C. Može se zaključiti da su vreme pretretmana od 15 min i temperatura vode unutar kupatila od 25 °C optimalni za postizanje većih stepena hidrolize proteina belanceta hidrolizovanih alkalazom. Za usvojene optimalne uslove pretretmana UZK-40kHz zabeleženo je povećanje početne brzine reakcije i ravnotežnog *SH* od 139,8 i 13, 86%, redom, u poređenju sa kontrolom. Slično ovim rezultatima, Uluko i sar. (2013) su utvrdili da soniciranje koncentrata proteina mleka ultrazvukom snage 800 W dovodi do poboljšanja enzimske hidrolize katalizovane različitim proteazama i do 184,9%, u zavisnosti od korišćenog enzima i vremena ultrazvučnog pretretmana [170]. Takođe, Ren i sar. (2014) su pokazali da ultrazvučni pretretman frekvence 40 ± 2 kHz utiče na povećanje stepena hidrolize proteina kukuruza za oko 11,5% u odnosu na kontrolu [381].



Slika 7.16. Krive hidrolize u funkciji temperature i vremena ultrazvučnog pretretmana frekvence 40 kHz (a) i 35 kHz (b)

(Uslovi hidrolize: 50 °C, pH 8, 2,12 AU/g alkalaze, 10%-tni vodeni rastvor belanceta, maseni odnos E/S 2:81)

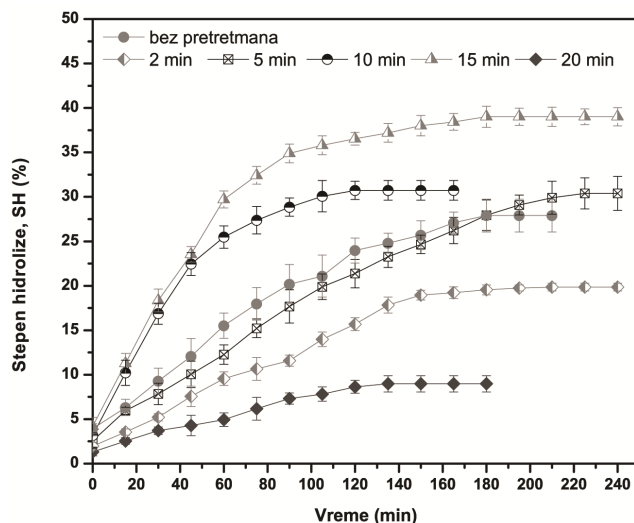
Kod UZK-35 kHz uočljiv je drastičan pad početne brzine enzimske reakcije i *SH* sa vremenom pretretmana, u poređenju sa kraćim pretretmanom (15 min). Povećanjem vremena pretretmana od 15 do 60 min, pri temperaturi vode unutar kupatila od 25 °C, ostvaren je značajan ($p < 0,05$) pad *SH*, sa 33,6% na 26,0%. Ovaj pad je još drastičniji nakon zagrevanja vode unutar kupatila na 55 °C (sa 33,2% na 10,6%). Jasno se vidi da povećanje temperature vode unutar kupatila nije dovelo do očekivano visokih stepena hidrolize, sa izuzetkom vremena pretretmana od 30 min, pa se može pretpostaviti da previše dugo izlaganje ultrazvučnim talasima u kombinaciji sa zagrevanjem medijuma unutar koga se vrši prenos talasa (voda unutar kupatila) negativno utiče na enzimsku reakciju hidrolize zbog formiranja proteinskih agregata. Vizuelno je i potvrđeno da se u ovom slučaju dobio mutan uzorak u formi suspenzije, kao posledica obrazovanja agregata proteina belanceta.

Neznatno povećanje *SH* nakon 30 min pretretmana na temperaturi od 55 °C je u skladu sa podatkom pronađenim u literaturi, gde je utvrđeno da soniciranje na povišenoj temperaturi, ali nižoj od ~58 °C, na kojoj dolazi do koagulacije i denaturacije proteina belanceta, može uticati na poboljšanje reakcije hidrolize kokošijeg belanceta zbog slabljenja ultrazvučnih talasa sa povećanjem temperature [382]. Deo kinetičke energije

talasa je apsorbovan i pretvoren u mehaničku i toplotnu energiju odgovornu za nastale strukturne promene unutar molekula proteina.

Generalno, može se konstatovati da ultrazvučni pretretman utiče na strukturne promene proteina belanceta koje doprinose efikasnijoj hidrolizi, ali predugo dejstvo ultrazvučnih talasa (60 min) ima negativan efekat na naknadnu reakciju hidrolize. Ova pojava je posledica formiranja proteinskih agregata usled predugog izlaganja proteina ultrazvučnim talasima. Ovako formirani agregati nisu povoljni supstrati za odgovarajuću proteazu, jer je dejstvo enzima smanjeno i otežano usled smanjenja dostupnosti peptidnih veza unutar molekula proteina. Ova zapažanja su u saglasnosti sa rezultatima Jambrakove i sar. (2014) koji su ustanovili da produženo dejstvo ultrazvuka frekvence 40 kHz utiče na formiranje agregata izolata proteina surutke [155].

Za razliku od pretretmana UZK-40kHz i UZK-35kHz, kod pretretmana UZS-20kHz ispitano je samo uticaj vremena pretretmana na efikasnost enzimske hidrolize proteina belanceta katalizovanu alkalazom, jer se temperatura održavala konstantnom (25 ± 1 °C) proticanjem termostatirane vode kroz vodeni plašt reakcionog suda. Rezultati su predstavljeni na Slici 7.17. Uočena je promena toka reakcije hidrolize za sva ispitana vremena pretretmana, ali su značajno veći ($p < 0,05$) stepeni hidrolize dobijeni samo nakon 10 i 15 min pretretmana, u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Hidrolizat sa najvećim *SH* od $40,5 \pm 1,03\%$ dobijen je nakon 15 min pretretmana UZS-20kHz. Jasno se vidi da kraće vreme pretretmana (2 min i 5 min), kao i produženo soniciranje (20 min) nepovoljno utiču na sam tok reakcije hidrolize, te je stoga vreme pretretmana od 15 minuta usvojeno kao optimalno za dalje analize.



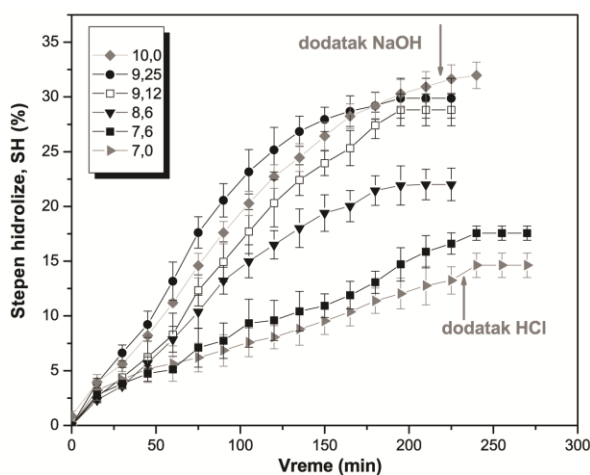
Slika 7.17. Stepen hidrolize proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz u funkciji vremena pretretmana (10% -tni vodeni rastvor belanceta; alkalaza 2,12 AU/g; pH 8, 50°C)

Literaturni podaci ukazuju na to da je ultrazvučnim pretretmanom (600 W, 20 °C, 10 min) obezmašćenih proteina pšeničnih klica došlo do povećanja brzine reakcije i ravnotežnog stepena hidrolize [383]. Međutim, rezultati dobijeni u okviru ovog istraživanja su u suprotnosti sa pojedinim studijama koje su pokazale da ultrazvučni pretretman nije značajno uticao na povećanje stepena hidrolize različitih proteina ili je imao minimalan uticaj [330,384]. Na primer, Lei i sar. (2011) su uočili da hidroliza ultrazvučno pretretiranog ovotransferina termolizinom nije unapređena, iako je pokazano da je došlo do povećanja reaktivnih SH grupa 5% rastvora ovotransferina čak za 50%. Ovo neslaganje u rezultatima može biti posledica korišćenja različitih proteaza, ali se može objasniti i činjenicom da je u okviru ove teze korišćena smeša proteina belanceta, za razliku od čistog model proteina ovotransferina koji su koristili navedeni autori [322]. Ako se uzme u obzir to da je ovalbumin najzastupljeniji protein u belancetu i da poseduje samo jednu disulfidnu vezu, u poređenju sa ovotransferinom koji ima 15 disulfidnih veza i glikanski lanac na C-terminalnom domenu koji stabilizuje njegovu trodimenzionalnu strukturu, uočeno neslaganje u rezultatima se može pripisati većoj otpornosti ovotransferina ka ultrazvučnim talasima. Uopšteno govoreći, mehanizam dejstva ultrazvučnih talasa na denaturaciju proteina je specifičan i zavisi od aminokiselinskog sastava proteina i njegove konformacije.

Takođe, jako je bitna vrsta primenjenog ultrazvučnog uređaja, kao i medijum unutar koga se vrši prenos ultrazvučnih talasa, ali i uslovi izvođenja samog pretretmana.

7.8.2. Uticaj kombinovanog dejstva ultrazvuka i pH pretretmana na stepen hidrolize proteina belanceta

Poznato je da promene pH vrednosti supstrata mogu da dovedu do denaturacije proteina promenom raspodele naelektrisanja i konformacije molekula i tako dodatno utiču na ultrazvučni tretman, koji izazivajući promene u strukturi molekula, olakšava pristupačnost proteaza ka unutrašnjim peptidnim vezama [385]. Zbog toga, u okviru ovog istraživanja ispitan je uticaj pH vrednosti rastvora belanceta tokom ultrazvučnog pretretmana na tok reakcije hidrolize katalizovane alkalazom. Za ovu svrhu, pH vrednosti 10%-tnih vodenih rastvora belanceta su, neposredno pre ultrazvučnog pretretmana, podešene na pH 10 sa 1 M rastvorom NaOH ili na pH 7 sa 1 M rastvorom HCl. Analize su urađene primenom pretretmana UZK-35kHz tokom 15 min. Nakon ultrazvučnog pretretmana, uzorci su podvrgnuti reakciji enzimske hidrolize pomoću alkalaze i dobijeni rezultati su prikazani na Slici 7.18.



Slika 7.18. Stepen hidrolize u funkciji vremena pri različitim pH vrednostima ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta

(Pretretman: 35kHz, 15 min, 25 °C; Uslovi hidrolize: 50 °C, pH 8, 2,12 AU/g alkalaze, 10% -tni vodeni rastvor belanceta)

Može se primetiti da povećanje pH vrednosti utiče na povećanje brzine enzimske reakcije hidrolize proteina belanceta. Pri pH 9,25, zabeležen je ravnotežni stepen hidrolize

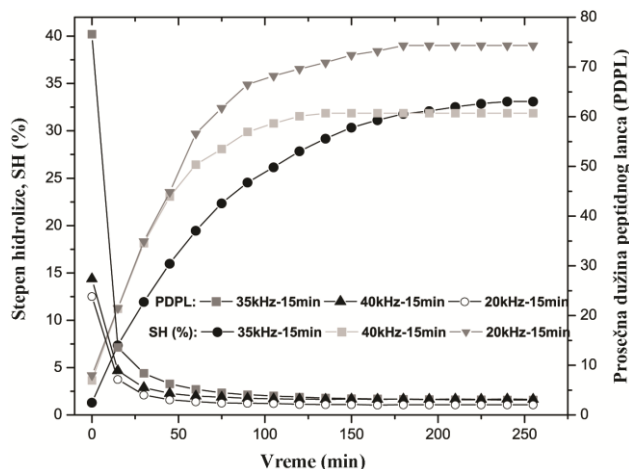
od $29,9 \pm 1,82\%$, dok je na pH 7,6 ova vrednosti bila $17,6 \pm 0,65\%$. Ovo je verovatno posledica smanjenja agregacije proteina pri većim pH vrednostima na kojima su odbojne sile među molekulima veoma jake.

Treba istaći da je pH rastvora dvojako uticao na hidrolizu. Naime, sam dodatak rastvora NaOH pre ultrazvučnog pretretmana negativno je uticao na naknadnu hidrolizu proteina belanceta. Bolji rezultati su dobijeni pri pH 9,25, ali bez dodavanja baze (odgovara pH vrednosti nativnog belanceta) nego pri pH 10, kada je alkalnost podešena dodavanjem baze. Sveže belance ima pH vrednost od 7,6-8,5 koja se povećava u zavisnosti od dužine stajanja do maksimalne vrednosti od oko 9,7 [20]. Šarp (Sharp) i sar.(1931) su došli do saznanja da već posle 21 dan lagerovanja pH vrednost albumina iznosi 9,4, bez obzira na temperaturu lagerovanja (3-35 °C) [386]. Interesantno je napomenuti da kada se svežem albuminu podesi bazna pH vrednost dodatkom 1 M rastvora natrijum-hidroksida, ne postiže se isti efekat kao sa prirodno baznim odležalim belancetom, što ukazuje na to da je struktura svežeg albumina stabilnija i manje podložna dejstvu proteza. Ovo povećanje pH vrednosti je posledica gubitka CO₂ kroz pore ljuske jajeta i zavisi od stepena rastvorljivosti CO₂, prisustva bikarbonatnih i karbonatnih jona i ravnoteže proteina. Koncentracija bikarbonatnih i karbonatnih jona uslovljena je parcijalnim pritiskom CO₂ u spoljašnjoj sredini. Stoga, pri pH vrednosti koja odgovara svežem belancetu (7,6 i 8,6), proteini belanceta su se pokazali kao otporniji na dejstvo alkalaze i ostvaren je manji stepen hidrolize. Dobijeni rezultati su pokazali da su najveća brzina enzimske reakcija, kao i najveći ravnotežni *SH* dobijeni pri pH 9,25. Ostvareni su gotovo 2,5 puta veći stepeni hidrolize pretretman UZK-35kHz pri pH 7,6. Ova zavisnost pH vrednosti belanceta i stepena hidrolize je bitna u praktičnom smislu, jer se pH vrednost belanceta povećava tokom njegovog skladištenja.

7.8.3. Prosečna dužina peptidnih lanaca hidrolizata

Dužina peptidnog lanca predstavlja prosečnu molekulsku masu peptida nastalih tokom reakcije enzimske hidrolize proteina belanceta. Hidrolizati sa sličnom prosečnom dužinom peptidnih lanaca (PDPL) mogu imati sasvim drugačiji profil nastalih peptida. Nakon određivanja stepena hidrolize, izračunata je prosečna dužina peptidnih lanaca, uz pretpostavku da su svi hidrolizati rastvorljivi i rezultati su prikazani na Slici 7.19.

Na dijagramu se jasno vidi razlika u prosečnoj dužini lanaca hidrolizata proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnim talasima različitih frekvenci pri usvojenim procesnim parametrima (pH 9,25, 25 °C, 15 min), a prikazani rezultati su i u saglasnosti sa ostvarenim stepenima hidrolize.



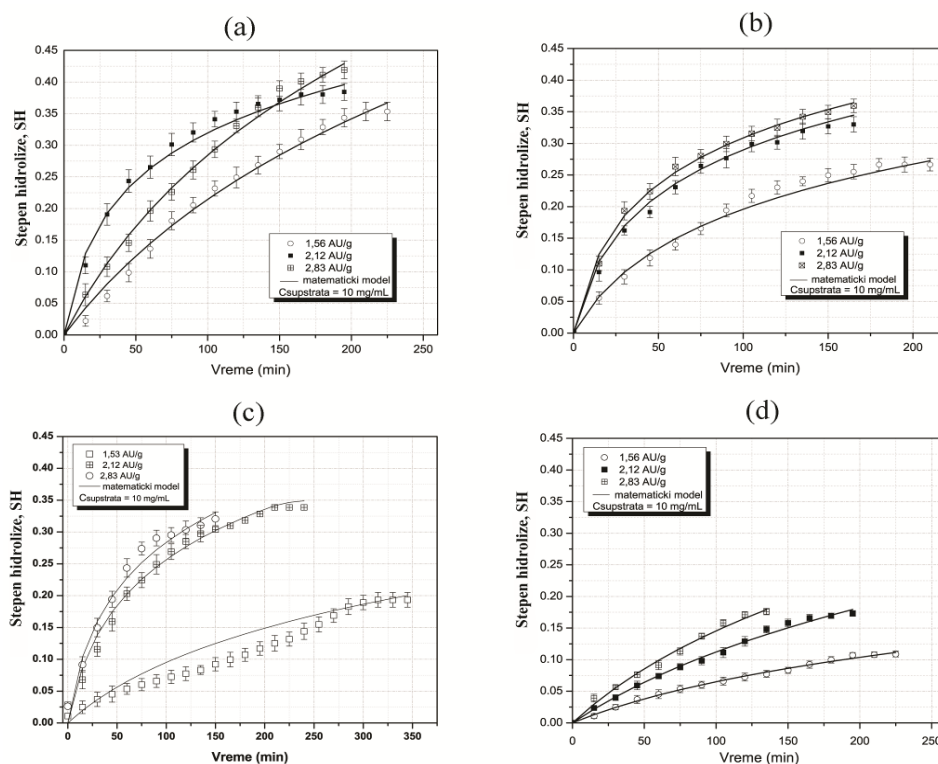
Slika 7.19. Krive hidrolize i prosečna dužina peptidnih lanaca hirolizata proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnim talasima frekvence 20kHz, 35kHz i 40kHz tokom 15 min (Uslovi hidrolize: 50 °C, pH 8, 2,12 AU/g alkalaze, 10% -tni vodeni rastvor belanceta)

Nakon ultrazvučnih pretretmana, došlo je do smanjenja *PDPL*, a najveće smanjenje je zabeleženo nakon pretretmana UZS-20kHz. Posle 15 min pretretmana UZS-20kHz *PDPL* smanjena je sa 24 na 2 aminokiselinska ostatka. Za pretretman UZK-35kHz *PDPL* je smanjena sa 77 na 3 aminokiselinska ostatka, nakon 4 h hidrolize, dok je za pretretman UZK-40kHz sa 28 na 3 aminokiselinska ostatka, ali nakon 2 h hidrolize. Takođe, može se zaključiti da su za pretretman UZS-20kHz i UZK-40kHz ostvareni skoro identični profili peptida. Prosečan broj nastalih aminokiselinskih ostataka tokom reakcije hidrolize nakon soniciranja proteina belanceta UZS-20kHz i UZK-40kHz je manji u poređenju sa prosečnim brojem nastalih nakon pretretmana UZK-35kHz. Ova činjenica ukazuje na to da UZS-20kHz i UZK-40kHz izazivaju veće strukturne promene molekula proteina, olakšavajući na taj način hidrolizu peptidnih veza.

7.9. UTICAJ ULTRAZVUČNOG PRETRETMANA NA KINETIKU REAKCIJE HIDROLIZE PROTEINA BELANCETA

Prilikom ispitivanja odgovarajućeg empirijskog kinetičkog modela hidrolize proteina belanceta, svi eksperimenti hidrolize su izvođeni pri istim reakcionim uslovima u šaržnom reaktoru sa mehaničkim mešanjem koje je ostvareno upotrebom mešalice sa četiri propelera. Kako bi se potvrdio pretpostavljeni mehanizam reakcije hidrolize proteina belanceta, ispitan je uticaj tri različita ultrazvučna pretretmana na brzinu reakcije. Početna kinetika reakcije hidrolize ispitan je pri različitim operativnim uslovima, variranjem početne koncentracije enzima i početne koncentracije supstrata. Reakcije hidrolize je izvedena pri optimalnim reakcionim uslovima za dejstvo alkalaze (50 °C, pH 8 i 240 obr/min).

Najpre je ispitan uticaj početne količine enzima (1,53 AU/g, 2,12 AU/g i 2,83 AU/g) i dobijeni eksperimentalni rezultati, za sva tri pretretmana, modelovani su predloženim kinetičkim modelom koji uzima u obzir inhibiciju supstratom u višku i dezaktivaciju enzima, pri čemu su krive zavisnosti stepena hidrolize od vremena prikazane na Slici 7.20.



Slika 7.20. Uticaj početne koncentracije enzima na stepen hidrolize proteina belanceta u jedinstvenom enzimskom procesu: (a) hidroliza belanceta pretretiranog ultrazvučnim

talasima frekvence 20 kHz, (b) hidroliza belanceta pretretiranog ultrazvučnim talasima frekvence 40 kHz, (c) hidroliza belanceta preteriranog ultrazvučnim talasima frekvence 35 kHz, (d) hidroliza bez pretretmana (kontrola)

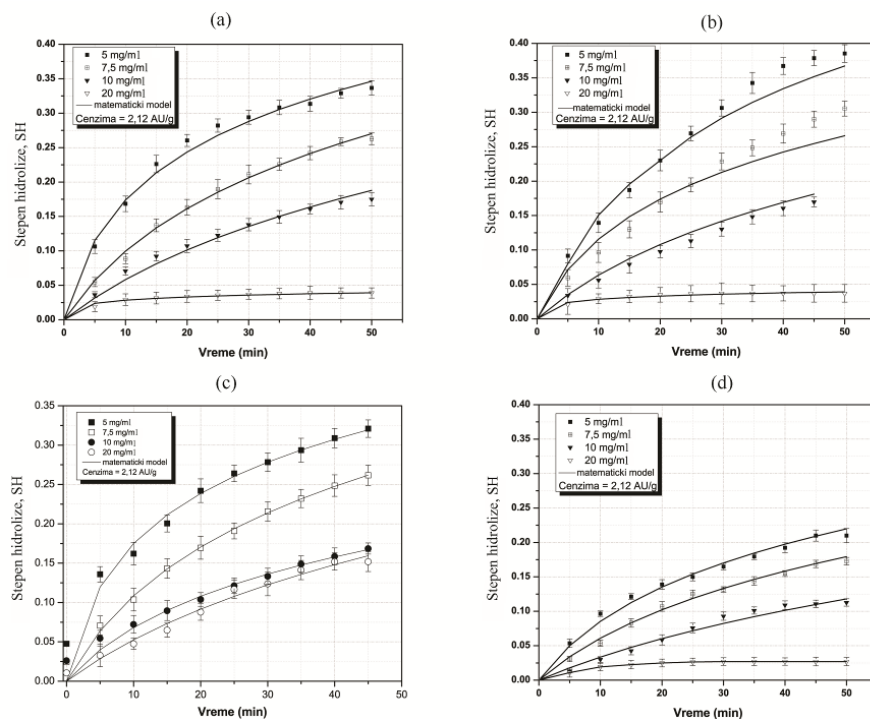
(Uslovi hidrolize: 50 °C, pH 8, 10%-tni vodeni rastvor belanceta, vreme trajanja tretmana 15 minuta)

Može se primetiti da dolazi do povećanja brzine reakcije hidrolize sa povećanjem početne koncentracije enzima za sva tri ultrazvučna pretretmana. U sva tri slučaja, pokazano je da su najniži stepeni hidrolize (*SH*) dobijeni sa najmanjom koncentracijom enzima (1,56 AU/g). Očigledno je da, kada je supstrat prisutan u dovoljnoj koncentraciji, tada sa porastom koncentracije enzima dolazi do povećanja brzine enzimske reakcije. Međutim, primećene su veoma male razlike u početnim brzinama reakcije i krajnjim stepenima hidrolize sa povećanjem koncentracije enzima sa 2,12 AU/g na 2,83 AU/g. Ova pojava se može objasniti činjenicom da pri većim koncentracijama enzima verovatno dolazi do pojave sternih smetnji i otežanoj adsorpciji enzima na molekul supstrata, koje se manifestuju smanjenim brojem dostupnih mesta za vezivanje enzima. Manji broj dostupnih mesta za vezivanje enzima dovodi do manje efikasnosti enzimske reakcije usled smanjenog broja molekula proteina za koje enzim može da se veže. Enzimska reakcija hidrolize ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta pri različitim koncentracijama enzima je u skladu sa predloženim empirijskim kinetičkim modelom. Takođe, rezultati su u saglasnosti sa podacima pronađenim u literaturi, čiji je predmet istraživanja bila enzimska hidroliza biljnih proteina [387,388].

Pretretman UZS-20kHz se pokazao kao najefikasniji u pogledu promene brzine enzimske reakcije. U poređenju sa pretretmanima UZK-40kHz i UZK-35kHz zabeleženo je povećanje aktivnosti enzima koje se manifestovalo većim stepenom hidrolize pri manjim koncentracijama enzima (Slika 7.20a). Značajno veća brzina reakcije je postignuta pri početnoj koncentraciji enzima od 2,12 AU/g nego pri koncentraciji od 2,83 AU/g. Takođe, rezultati pokazuju da je pri koncentracijama enzima većim od 1,56 AU/g došlo do relativno oštrog povećanja stepena hidrolize tokom prvih 50 min reakcije. Pomenuti trend je posebno primetan pri početnoj koncentraciji enzima od 2,12 AU/g, gde je nakon 50 min reakcije proreagovalo manje od 20% početne koncentracije supstrata. Na osnovu rezultata, može se

zaključiti da je značajno ($p < 0,05$) povećanje brzine enzimske reakcije hidrolize proteina belanceta nakon pretretmana UZS-20kHz posledica intenzivne kavitacije indukovane ultrazvučnom sondom. Kavitacija utiče na karakteristične strukturne promene molekula, dovodeći do odmotavanja proteina i na taj način olakšava dostupnost supstrata enzimu [389-391]. Isto tako, dolazi do smanjenja difuzionih limitacija prilikom vezivanja enzima za supstrat i povećanja brzine enzimske reakcije. Drugi istraživači su, isto kao i u ovom istraživanju, pokazali da primena ultrazvučne sonde dovodi do promene unutar sekundarne strukture goveđeg seruma albumina, ali i da ultrazvučni pretretman utiče na povećanje brzine enzimske reakcije hidrolize proteina [156,389,392].

Koncentracija supstrata je, takođe, veoma bitan faktor koji se mora uzeti u obzir prilikom ispitivanja brzine enzimske reakcije. S tim u vezi, ispitan je uticaj početne koncentracije supstrata na brzinu reakcije hidrolize ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta katalizovanu alkalazom i rezultati su predstavljeni na Slici 7.21. Svi eksperimentni su uzvedeni pri istim reakcionim uslovima i sa usvojenom početnom koncentracijom enzima 2,12 AU/g, a vrednosti početnih koncentracija supstrata bile su: 5 mg/ml, 7,5 mg/ml, 10 mg/ml i 20 mg/ml.



Slika 7.21. Uticaj početne koncentracije supstrata na stepen hidrolize proteina belanceta u jednostepenom enzimskom procesu: (a) hidroliza belanceta pretretiranog ultrazvučnim

talasima frekvence 20 kHz, (b) hidroliza belanceta pretretiranog ultrazvučnim talasima frekvence 40 kHz, (c) hidroliza belanceta pretretiranog ultrazvučnim talasima frekvence 35 kHz, (d) hidroliza bez pretretmana (kontrola)

(Uslovi hidrolize: 50 °C, pH 8, 2,12 AU/g alkalaze, 10%-tni vodeni rastvor belanceta, vreme trajanja tretmana 15 minuta)

Na osnovu dobijenih rezultata, može se reći da je došlo do značajnog ($p < 0,05$) smanjenja stepena hidrolize sa povećanjem koncentracije supstrata i da je njegova najveća vrednost zabeležena pri najmanjoj koncentraciji supstrata (5 mg/ml), za sva tri pretretmana. Povećanjem početne koncentracije supstrata, broj hidrolizovanih peptidnih veza u vremenu reakcije je smanjen, pa se može pretpostaviti da je došlo do inhibicije supstratom u višku. Inhibicija supstratom u višku sprečava nastajanje proizvoda reakcije zbog nemogućnosti razlaganja neaktivnog enzim-supstrat kompleksa [393]. Takođe, kada je prisutan inhibitor u reakcionom sistemu, u ovom slučaju sam proizvod reakcije, dolazi do nadmetanja molekula supstrata sa molekulima peptida (inhibitori), koji neprestano nastaju tokom reakcije enzimske hidrolize proteina belanceta. Kako se reakcija između enzima i peptida koji imaju ulogu inhibitora odigrava bez nastanka novih amino grupa, njihov doprinos ukupnoj brzini reakcije hidrolize jednak je nuli. Pošto se određena količina enzima troši na vezivanje za inhibitorne peptide, dolazi do smanjenja ukupne brzine reakcije.

Mnogobrojni naučnici koji su proučavali kinetiku enzimskih reakcija hidrolize proteina, ustanovili su da smanjenje brzine reakcije hidrolize sa povećanjem koncentracije supstrata može biti posledica sledećih faktora: smanjenja koncentracije dostupnih peptidnih veza, inhibicije supstratom ili proizvodom i deaktivacije enzima [388]. Kako bi sa sigurnošću utvrdili razlog smanjenja brzine reakcije sa povećanjem koncentracije supstrata, nakon 90 min reakcije, u reakcionom sistemu je dodata nova količina supstrata, ali nije primećeno povećanje stepena hidrolize. Zaključak je bio da koncentracija dostupnih peptidnih veza nije limitirajući faktor koji je uticao na smanjenje brzine reakcije hidrolize. Takođe, ustanovljeno je da stepen hidrolize značajno raste nakon dodatka nove količine alkalaze, navodeći na zaključak da je dezaktivacija enzima prisutna. Primenom sva tri ultrazvučna pretretmana, ostvareno je dobro slaganje eksperimentalnih rezultata sa predviđenim teoretskim vrednostima ($p < 0,05$), pa se predloženi empirijski kinetički model koji uzima u

obzir inhibiciju supstratom u višku i dezaktivaciju enzima (jednačine 6.20. - 6.22.) može smatrati pogodnim za optimizaciju procesa hidrolize proteina belanceta u šaržnom reaktorskom sistemu.

7.9.1. Određivanje kinetičkih parametara i kinetičkih konstanti

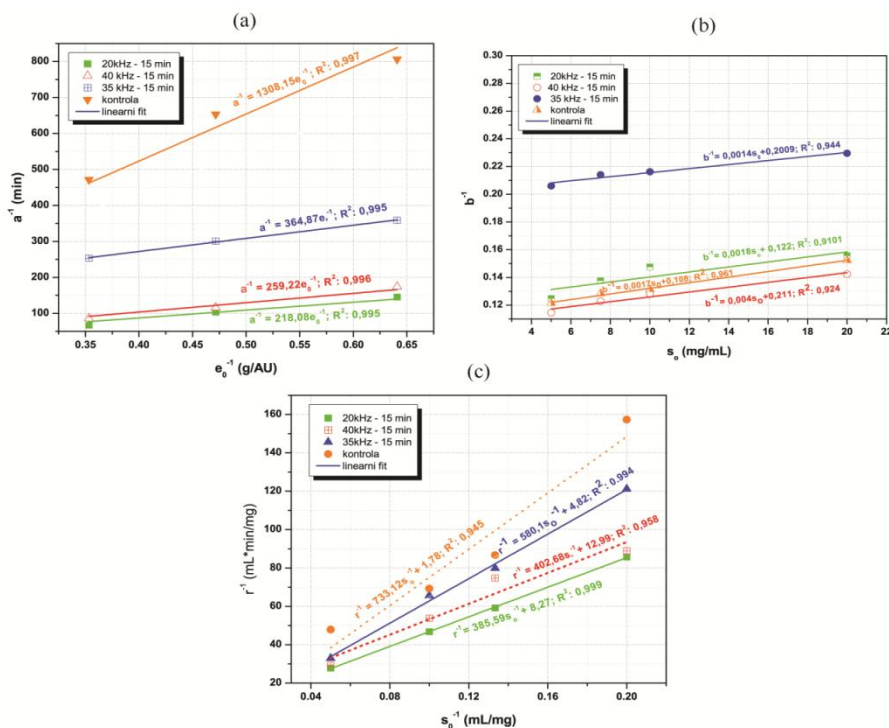
Empirijski kinetički model, koji je pokazao dobro slaganje sa eksperimentalnim rezultatima, pretpostavlja da je reakcija hidrolize belanceta nultog reda i uzima u obzir inhibiciju supstratom u višku, kao i denaturaciju enzima usled napada slobodnog enzima na enzim-supstrat kompleks u skladu sa reakcijom drugog reda. Vrednosti kinetičkih parametara a i b iz empirijske jednačine $dx/dt = a \cdot \exp(-bx)$ (gde je x stepen hidrolize, SH) usvojenog kinetičkog modela su izračunate metodom linearne regresije. Kinetički parametri poslužili su za kvantitativno poređenje efikasnosti ultrazvučnih pretretmana na reakciju hidrolize proteina belanceta. Njihove vrednosti značajno se razlikuju u zavisnosti od vrste ultrazvučnog pretretmana, kao i od koncentracije enzima i supstrata. Parametar a pokazuje očigledan trend sa promenom koncentracije enzima i supstrata za sva tri ultrazvučna pretretmana. Dakle, povećanje početne koncentracije enzima i supstrata uticalo je napovećanje i smanjenje vrednosti parametra a , respektivno (Tabela 7.5). Kao što se može videti na Slikama 7.20 i 7.21, sa povećanjem koncentracije enzima i smanjenjem koncentracije supstrata, brzina reakcije raste i ova zavisnost je povezana sa promenom vrednosti parametra a . Što se tiče parametra b , može se zaključiti da se njegova vrednost ne menja značajno ($p > 0,05$) sa promenom koncentracije enzima, izuzev kod pretretmana UZK-35 kHz. Vrednost parametra b je uslovljena samo koncentracijom supstrata i zabeleženo je njegovo smanjenje sa povećanjem koncentracije supstrata za sva tri ultrazvučna pretretmana. Očigledno je da na vrednost parametra b značajno manje utiče promena reakcionih uslova u poređenju sa parametrom a . Ovi rezultati su u saglasnosti sa literatunim čiji je predmet istraživanja bila enzimaska hidroliza globularnih i fibrilarnih proteina [341,388].

Tabela 7.5. Vrednosti kinetičkih parametara a i b dobijenih za reakciju hidrolize proteina belanceta pri različitim početnim koncentracijama enzima i suptrata

s_0 (mg/ml)	e_0 (AU/g)	a (min^{-1})				b			
		kontrola	20kHz	35kHz	40kHz	kontrola	20kHz	35kHz	40kHz
5	2,12	0,0086	0,0330	0,0250	0,0560	8,237	8,009	4,854	8,733
7,5		0,0068	0,0150	0,0190	0,0210	7,794	7,265	4,670	8,137
20		0,0013	0,0023	0,0025	0,0022	6,562	6,425	4,623	7,022
10	1,56	0,0012	0,0068	0,0027	0,0057	8,271	8,733	4,355	8,271
	2,12	0,0015	0,0097	0,0033	0,0086	8,256	8,285	8,065	8,396
	2,83	0,0021	0,0150	0,0039	0,0120	8,926	8,267	8,659	8,361

kontrola – netretirani 10%-tni rastvor belanceta; 20kHz – pretretmana ultrazvučnom sondom frekvence 20kHz tokom 15 min; 35kHz –pretretman ultrazvučnim kupatilom frekvence 35kHz tokom 15 min; 40 –pretretman ultrazvučnim kupatilom frekvence 40kHz tokom 15 min.

Metodom linearne regresije određene su kinetičke konstante K_1 , k_2 i k_d , a njihove vrednosti su radi preglednosti prikazane u Tabeli 7.6. Kinetičke konstante su određene na osnovu jednačina (6.21) i (6.22) iz nagiba i odsečaka pravih prikazanih na Slici 7.22. (Tabela 7.6).



Slika 7.22. Zavisnost $a^{-1} \sim e_0^{-1}$ (a), $b^{-1} \sim s_0$ (b), $r^{-1} \sim s_0^{-1}$ (c) i određivanje kinetičkih konstanti reakcije hidrolize ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta metodom linearne regresije

Na osnovu izračunatih vrednosti konstanti brzina reakcije, vidi se da se reakcija hidrolize proteina belanceta za sva tri ultrazvučna pretretmana odigrava brže u poređenju sa kontrolom (hidroliza bez pretretmana). Najveća konstanta brzine reakcije dobijena je nakon pretretmana UZS-20kHz, čime je brzina reakcije povećana čak pet puta, dok je najmanje povećanje brzine reakcije ostvareno nakon pretretmana UZK-35kHz. Ju (Yu) i sar. (2016) su ustanovili da nakon ultrazvučnog pretretmana (40 kHz, 15 min, 294 W, 35 °C) želatina i naknadne hidrolize kolagenazom dolazi do povećanja brzine reakcije za 27,5% [389]. Druga grupa autora je, takođe, došla do istog zaključka, proučavajući uticaj ultrazvuka na brzinu reakcije hidrolize proteina pšeničnih klica alkalazom, Ku (Qu) i sar. (2013) su utvrdili da je brzina reakcije povećana od 12,9-166,7%, u zavisnosti od vrste ultrazvučnog pretretmana [383]. Evidentno je, da se rezultati do kojih se došlo u okviru ovog istraživanja podudaraju sa literaturnim podacima, ali neophodno je istaći i naglasiti da su sva tri ultrazvučna pretretmana dovela do neuporedivo većih brzina reakcija, a ova povećanja su iznosila 488%, 400% i 222% za pretretman UZS-20kHz, UZK-40kHz i UZK-35kHz, redom.

Korisno je napomenuti da i vrednosti konstanti inhibicije K_I i konstante brzine dezaktivacije enzima, k_d značajno variraju u zavisnosti od vrste ultrazvučnog pretretmana, a njihove vrednosti se kreću u opsegu od 143,5 mg/ml do 0,144 min⁻¹ za pretretman UZK-35kHz do 67,89 mg/ml i 0,450 min⁻¹ za pretretman UZS-20kHz, redom. Zabeleženo povećanje k_d nakon sva tri pretretmana ukazuje na to da molekuli supstrata mogu efikasnije da se vežu za aktivna mesta enzima. Naime, vrednost konstante inhibicije K_I je veća za sva tri ultrazvučna pretretmana u odnosu na kontrolu, navodeći na zaključak da ultrazvuk utiče na smanjenje inhibicije enzima supstratom u višku. Ovo se može objasniti uticajem ultrazvučnih talasa na strukturu proteina belanceta, koji stupaju u direktnu vezu sa funkcionalnim grupama aktivnog centra enzima. Uočeno je da ultrazvuk dovodi do denaturacije proteina belanceta i narušavanja njihove strukture i to na takav način da istovremeno utiče na povećanje dostupnih peptidnih veza enzimu, ali smanjuje vezivanje enzima za supstrat, pa direktno utiče na inhibiciju enzima supstratom i na samu stabilnost enzima.

Tabela 7.6. Vrednosti kinetičkih konstanti reakcije hidrolize proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnim pretretmanom

	k_2 (min^{-1})	K_I (mg/ml)	k_d (min^{-1})
Kontrola	0,009±0,001	55,9±2,5	0,08±0,02
UZS-20kHz	0,053±0,002	67,9±2,7	0,45±0,01
UZK-40kHz	0,045±0,001	63,8±3,2	0,41±0,02
UZK-35kHz	0,029±0,003	143,5±6,4	0,144±0,05

Generalno, smanjena inhibicija enzima supstratom, kao i povećanje aktivnosti enzima i brzine reakcije, koji su utvrđeni ispitivanjem kinetike reakcije i određivanjem kinetičkih konstanti, govore da je došlo do unapređenja enzimske hidrolize proteina belanceta pretretiranih sa tri različita ultrazvučna pretetmana.

Uopšteno govoreći, na osnovu svih prikazanih rezultata može se reći da je reakcija hidrolize proteina belanceta u šaržnom reaktoru sa mehaničkim mešanjem reakcija nultog reda u odnosu na supstrat i da se može primeniti predložena empirijska jednačina za matematičko opisivanje eksperimentalnih rezultata utvrđenim vrednostima kinetičkih parametara. Eksperimentalni rezultati pokazali su da brzina reakcije raste do određene vrednosti koncentracije supstrata, a daljim povećanjem koncentracije dolazi do naglog pada brzine. Ovo ukazuje na to da je supstrat inhibitor u reakciji hidrolize. Dodavanjem sveže količine enzima u rekcionu smešu naglo je došlo do povećanja stepena hidrolize (rezultati nisu prikazani grafički), što pokazuje da u reakcionoj smeši ima dovoljno peptidnih veza na raspolaganju za hidrolizu, ali da je došlo do dezaktivacije enzima.

Na osnovu svega iznetog, upotreba kinetičkog modela koji uzima u obzir inhibiciju supstratom u višku i dezaktivaciju enzima, opravdana je i potvrđena, te se on može smatrati pogodnim za opisivanje toka hidrolize proteina belanceta u šaržnom reaktorskom sistemu.

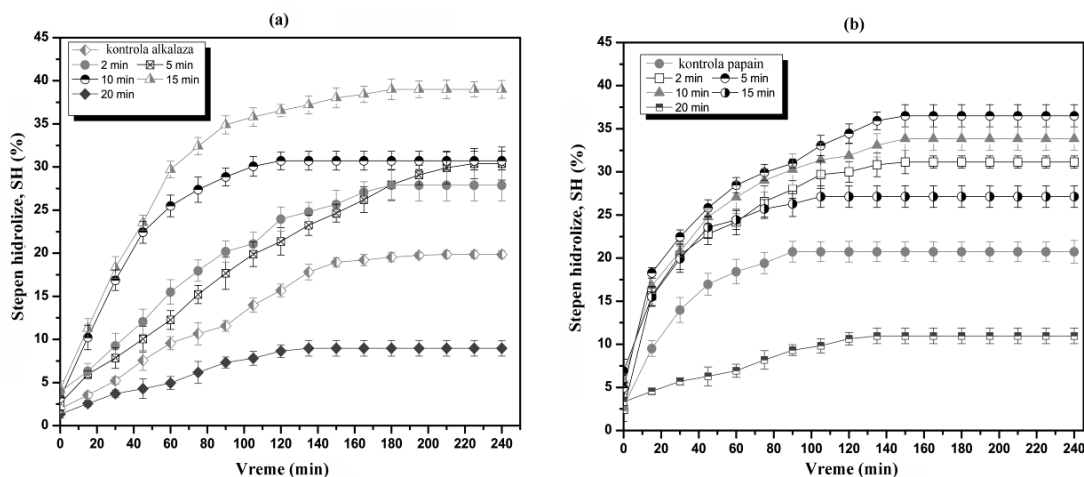
7.10. KARAKTERIZACIJA HIDROLIZATA PROTEINA BELANCETA DOBIJENIH POMOĆU ALKALAZE I PAPAINE

Iz prethodnih istraživanja koja su se odnosila na optimaziju procesa hidrolize proteina belanceta izborom odgovarajućeg ultrazvučnog pretretmana, možemo zaključiti da se kao najefikasniji pokazao pretretman UZS-20kHz. Naredna faza ispitivanja vodila je u smeru izbora odgovarajuće proteaze koja bi dovela do nastanka hidrolizata sa unapređenim funkcionalnim svojstvima. S tim u vezi, u ovom poglavlju, ispitan je uticaj dužine

pretretmana i vrste enzima na efikasnost enzimske hidrolize, funkcionalna svojstva i strukturne promene dobijenih hidrolizata pretretiranih UZS-20kHz.

7.10.1. Uticaj dužine pretretmana UZS-20kHz i vrste enzima na enzimsku hidrolizu proteina belanceta

Zahvaljujući vezi između kompaktnosti molekulske strukture i podložnosti proteina enzimskoj hidrolizi, strukturne promene proteina izazvane primenom ultrazvučnih talasa su analizirane ispitivanjem uticaja vrste enzima na efikasnost hidrolize proteina belanceta. Mnogobrojni proteolitički enzimi su se pokazali pogodnim za hidrolizu različitih proteina, ali se prednost daje enzimima koji vode poreklo iz mikroorganizama ili biljaka, zbog toga što im je cena koštanja niska, pa ne utiču mnogo na ukupne troškove vezane za sam proces enzimske hidrolize [277,394,395]. Upravo iz ovih razloga, ispitivanja u okviru ovog istraživanja su sprovedena korišćenjem komercijalno dostupnih proteolitičkih enzima alkalaze i papaina. Alkalaza iz *Bacillus licheniformis* pripada grupi alkalnih proteaza, dok je papain izolovan iz biljke *Carica papaya* cisteinska proteaza. Oba ova enzima su se pokazala kao veoma uspešni za dobijanje hidrolizata proteina sa poboljšanim funkcionalnim svojstvima [229,396,397]. Uticaj dužine pretretmana i vrste enzima na efikasnost enzimske hidrolize proteina belanceta prikazan je na Slici 7.23. Radi bolje preglednosti rezultata i poređenja, Slika 7.17. je umetnuta u Sliku 7.23a.



Slika 7.23. Tok hidrolize proteina belanceta katalizovane alkalazom (a) i papainom (b) u funkciji vremena ultrazvučnog pretretmana

(Pretretman: 20kHz, 2-20 min, 25 °C; Uslovi hidrolize: 50 °C, pH 8, maseni odnos E/S 2:81, 10%-tni vodeni rastvor belanceta)

Kao što se može primetiti, pretretman UZS-20kHz je značajano ($p < 0,05$) doprineo povećanju sposobnosti alkalaze i papaina da hidrolizuju prisutne peptidne veze unutar proteina belanceta. Ostvareno je povećanje početne brzine reakcije i krajnjih stepena hidrolize, sa povećanjem vremena pretetmana do 15 min, nakon čega je došlo do drastičnog pada brzine reakcije, a postignuti stepeni hidrolize bili su manji i od kontrolne hidrolize (bez pretetmana). Interesantno je napomenuti da je korišćenjem alkalaze ostvaren pravilan trend rasta stepena hidrolize sa povećanjem vremena pretetmana od 2-15 min, dok je kod papaina zabeleženo drugačije ponašanje. Ako se posmatraju krive kontrolne hidrolize za oba enzima (bez ultrazvučnog pretetmana), može se zapaziti da su dobijene vrednosti *SH* veoma bliske i iznose 19,85% i 20,74% za alkalazu i papain, redom. To je posledica toga što obe proteaze pripadaju grupi endopeptidaza, pa im je mehanizam dejstva identičan i zavisi samo od dostupnosti odgovarajućih peptidnih veza unutar proteina belanceta enzimu. Međutim, nakon ultrazvučnog pretetmana zabeležene su različite vrednosti stepena hidrolize, u zavisnosti od dužine trajanja pretetmana. Najveći stepeni od 36,5% i 39,01% dobijeni su nakon 5 i 15 min pretetmana za papain i alkalazu, redom. Ovakav rezultat može biti posledica male egzopeptidazne aktivnosti papaina, pa je kraće vreme pretetmana dovelo do najefikasnije hidrolize. Dokazano je da papain u nekim slučajevima može delovati kao egzopeptidaza, prilikom čega dolazi do oslobađanja histidina i treonina sa karboksilnog kraja peptidnog lanca [398]. Nešto veći *SH* postignut nakon hidrolize alkalazom može se pripisati nasumičnom cepanju peptidnih veza koje u bočnim lancima sadrže aromatične aminokiseline, u poređenju sa selektivnim dejstvom papaina, koji uglavnom deluje na osnovne aminokiseline, a naročito na arginin, lizin i fenilalanin [86]. Takođe, veći *SH* je posledica veće proteolitičke aktivnosti alkalaze, jer je poznato da alkalne proteaze poseduju veću proteolitičku aktivnost u poređenju da neutralnim proteaza, kakav je papain [399,400].

Generalno, povećanje efikasnosti enzimske hidrolize ultrazvučno pretetiranih supstrata u poređenju sa sirovim belancetom, može se pripisati konformacionim promenama proteina izazvanim ultrazvučnim talasima koji su doveli do delimičnog ili potpunog odmotavanja polipeptidnih lanaca povećavajući broj dostupnih peptidnih veza za koje enzim može da se veže. Previše dugo izlaganje ultrazvučnim talasima (20 min) se pokazalo neefikasnim, pa se

može pretpostaviti da nakon 20 min pretretmana dolazi do agregacije proteina belanceta koja utiče na smanjenje broja dostupnih peptidnih veza za hidrolizu alkalazom i papainom.

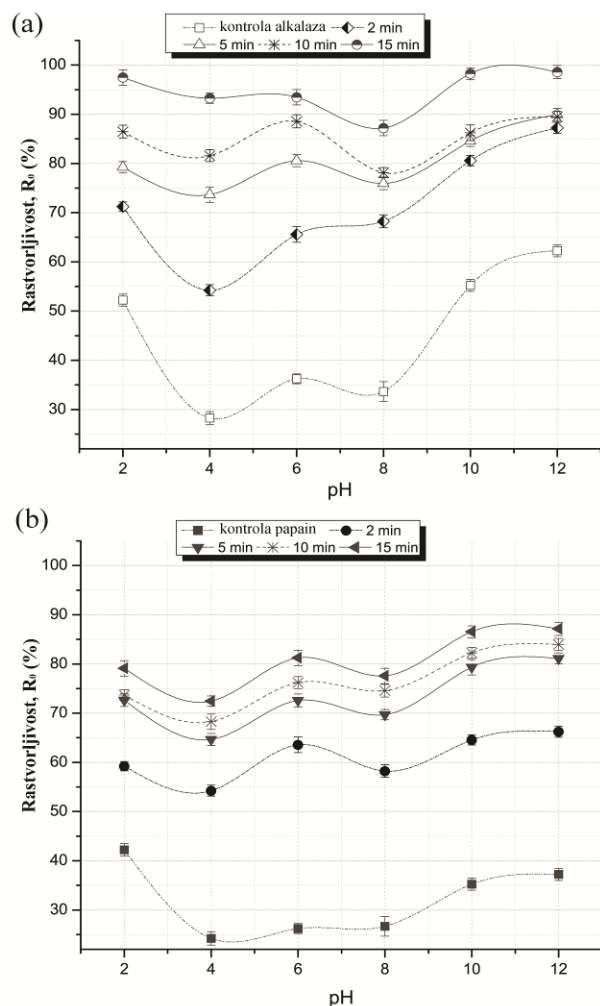
7.10.2. Uticaj dužine pretretmana UZS-20kHz i vrste enzima na funkcionalna svojstva hidrolizata proteina belanceta (HPB)

Prethodno analizirani rezultati su pokazali da je ultrazvučni pretretman uticao na poboljšanje funkcionalnih svojstava proteina belanceta (poglavlje 7.7.1), ali mogućnost dobijanja proteina sa još boljim karakteristikama se postiže adekvatnom enzimskom hidrolizom koja utiče na promenu veličine molekula, hidrofobnost, polarnost i jonizujuće grupe proteinskih hidrolizata, pa samim tim dovodi do promena funkcionalnih svojstava dobijenih hidrolizata.

Funkcionalna svojstva hidrolizata dobijenih hidrolizom pomoću alkalaze i papaina analizirana su sa aspekta rastvorljivosti (R_0), svojstava penjenja, svojstava formiranja emulzija i sadržaja sulfhidrilnih grupa. Navedena svojstva zavise od specifičnosti samog enzima i stepena hidrolize, pa je adekvatan izbor enzima veoma bitan kako bi se obezbedila maksimalna funkcionalnost dobijenih hidrolizata.

U velikom broju radova iz literature, pokazano je da dolazi do povećanja rastvorljivosti proteina nakon procesa hidrolize, te se može reći da je rastvorljivost jedna od najvažnijih funkcionalnih osobina proteina koju bi trebalo ispitati. Rastvorljivost neposredno utiče na druga funkcionalna svojstva proteina, kao i na kvalitet krajnjeg proizvoda.

Uticaj dužine pretretmana UZS-20kHz na rastvorljivost hidrolizata pripremljenih pomoću alkalaze i papaina, u opsegu pH vrednosti od 2-12 prikazan je na Slici 7.24. Kao što se vidi, oba hidrolizata su pokazala rastvorljivost veću od 72% u širokom opsegu pH vrednosti za vreme pretretmana od 2-15 min. Rastvorljivost je bila značajno narušena nakon 20 min ultrazvučnog pretretmana, te stoga, ti rezultati nisu ilustrovani na Slici 7.24. Najmanja rastvorljivost (54,2%) zabeležena je pri pH 4, dok su vrednosti od 80% i 70% primetne na ostalim pH vrednostima i nakon produženog dejstva ultrazvučnog pretretmana, za alkalazu i papain, redom. Ovakvi rezultati ukazuju na prisustvo zaostalih proteina i/ili peptida sa velikom molekulskom masom nakon enzimske hidrolize, koji očigledno dovode do precipitacije na pH 4. Ako se zna da je izoelektrična tačka (pI) proteina belanceta na pH 4,5, ovo je veoma opravdano objašnjenje, jer su vrednosti pH jako bliske.

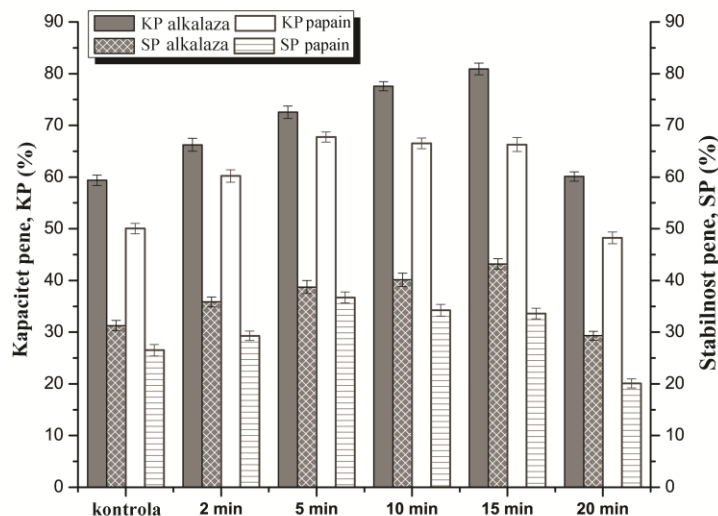


Slika 7.24. Uticaj dužine ultrazvučnog pretretmana na rastvorljivost hidrolizata proteina belanceta dobijenih pomoću alkalaze (a) i papaina (b) u funkciji pH vrednosti (Pretretman: 20kHz, 2-20 min, 25 °C; Uslovi hidrolize: 50 °C, pH 8, maseni odnos E/S 2:81, 10% -tni vodeni rastvor belanceta)

Povećanje rastvorljivost u funkciji vremena pretretmana je u korelaciji sa prethodno dobijenim stepenima hidrolize (Slika 7.23.), sa značajnom razlikom ($p < 0,05$) među svim testiranim hidrolizatima. Takođe, rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživača koji su ustanovili značajno povećanje rastvorljivost hidrolizata sa visokim stepenima hidrolize [401,229]. Generalno, može se reći da je rastvorljivost hidrolizata dobijenih pomoću alkalaze nešto malo veća u poređenju sa hidrolizatima dobijenim pomoću papaina, što je i očekivano, jer je hidroliza alkalazom dala veće vrednosti stepena hidrolize. Uticaj ultrazvuka na povećanu rastvorljivost ogleda se u tome što nakon ultrazvučnog pretretmana

dolazi do izlaganja hidrofilnih aminokiselina iz unutrašnjosti molekula proteina ka molekulima vode. Usled povećanje dostupnosti hidrofilnih aminokiselinskih ostataka, dolazi do reorganizacije molekula vode oko njih i povećanja rastvorljivosti. Promene nastale u trodimenzionalnoj strukturi proteina, izazvane ultrazvučnim talasima, dovode do povećanja broja naelektrisanih grupa (NH_4^+ , COO^-) i u ovakvim uslovima dolazi do učestalijih interakcija između proteina i molekula vode usled jakih elektrostatičkih sila. Takođe, povećana rastvorljivost je posledica unapređenja enzimske hidrolize proteina belanceta nakon ultrazvučnog pretretmana, jer enzimaska hidroliza ima uticaj na veličinu i hidrofobnost molekula proteina, kao i na polarnost i broj jonizujućih grupa. Manji peptidi koji se dobijaju pri većim vrednostima stepena hidrolize imaju više polarnih regiona nego nehidrolizovani ili slabo hidrolizovani proteini, pa shodno tome mogu formirati jače vodonične veze sa molekulima vode i postati rastvorljiviji u vodenim rastvorima [402,403].

Veliki broj radova u literaturi bavio se uticajem ultrazvučnog pretretmana na svojstva penjenja nativnih proteina, ali dosta manje informacija ima o uticaju ultrazvuka na svojstva penjenja hidrolizata proteina dobijenih primenom različitih enzima. Osnovni preduslovi koje protein treba da zadovoljava kako bi imao ovu sposobnost jeste da se brzo adsorbuje tokom procesa mešanja na graničnoj površini voda - vazduh, zatim da brzo menja svoju konformaciju i raspored funkcionalnih grupa na površini molekula kao i da ima mogućnost formiranja kohezivnog viskozno - elastičnog filma pomoću intermolekulskih interakcija [3]. Zna se da proteini belanceta imaju odlična svojstva ka sposobnosti formiranja pene usled međusobnih interakcija proteina koji ulaze u njegov sastav, pa se u ovom delu rada ispitala mogućnost naknadnog poboljšanja penjenja primenom ultrazvučnog pretretmana pre enzimske hidrolize proteina belanceta. Dobijeni rezultati svojstava penjenja ultrazvučno pretretiranih hidrolizata pripremljenih pomoću alkalaze i papaina, prikazana su u formi kapaciteta pene (KP) i stabilnosti pene (SP) i predstavljena su na Slici 7.25.



Slika 7.25. Uticaj dužine ultrazvučnog pretretmana na svojstva penjenja hidrolizata proteina belanceta dobijenih pomoću alkalaze (obojeni stubići) i papaina (beli stubići) (Pretretman: 20kHz, 2-20 min, 25 °C; Uslovi hidrolize: 50 °C, pH 8, maseni odnos E/S 2:81, 10% -tni vodeni rastvor belanceta)

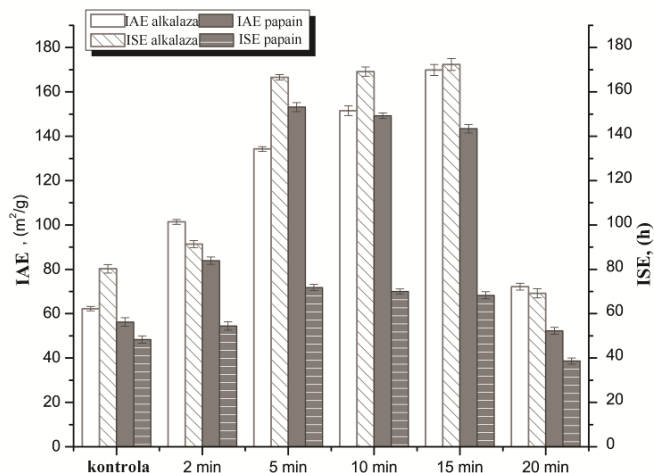
Sa povećanjem dužine pretretmana UZS-20kHz, hidrolizati pripremljeni sa oba enzima su pokazali statistički značajno ($p < 0,05$) veće vrednosti kapaciteta pene i stabilnosti pene u poređenju sa kontrolnim hidrolizama (bez pretretmana). Hidrolizati dobijeni hidrolizom proteina belanceta pomoću alkalaze dali su veće vrednosti *KP* i *SP* u odnosu na hidrolizate dobijene pomoću papaina, što je verovatno posledica većeg sadržaja peptida nastalih nakon hidrolize alkalazom. Nakon 15 min pretretmana UZS-20kHz i naknadne hidrolize alkalazom vrednosti kapaciteta pene i stabilnosti pene iznosile su 80,92% i 43,18%, redom. U poređenju sa kontrolnom hidrolizom, ostvareno je povećanje kapaciteta pene od 36,3% i stabilnosti pene od 38,1%. Kod hidrolizata papaina, najveće povećanje kapaciteta pene i stabilnosti pene je zabeleženo nakon 5 min pretretmana, a vrednosti su bile 67,75% i 36,72%, redom. Moguće objašnjenje razlike u rezultatima hidrolizata pripremljenih pomoću alkalaze i papaina je nastanak peptida sa različitim naelektrisanjem i površinskom hidrofobnošću nakon reakcije hidrolize. Ultrazvučni pretretman je više uticao na denaturaciju proteina koji su naknadno bili hidrolizovani alkalazom, a tokom hidrolize, formirani su peptidi manje molekulske mase, sa malim neto naelektrisanjem i velikom površinskom hidrofobnošću i kao takvi, bili su idealni da formiraju penu većeg kapaciteta i

stabilnosti. Kako i sama rastvorljivost proteina utiče na svojstva penjenja, može se zaključiti dobro slaganje rezultata sa prethodno analiziranim rezultatima (Slika 7.24).

Isto tako, poboljšanje svojstava penjenja može se pripisati efektu homogenizacije izazvane ultrazvučnim talasima koja se manifestuje brzom adsorpcijom proteina na graničnoj površini voda-vazduh. Usled promena u strukturi proteina belanceta izazvanih i ultrazvukom i, naknadno, pod uticajem enzima, oni zauzimaju takvu konformaciju kojom su omogućili smanjenje graničnog napona između vodene i vazdušne faze. Takođe, tokom ultrazvučnog pretretmana, proteini belanceta su se delimično odmotali i na taj način direktno uticali na povećanje svojstava penjenja, olakšavajući formiranje pene pri samom procesu sa homogenizatorom (metoda 6.3.11.2).

Ovakav trend je u saglasnosti sa rezultatima istraživača koji su pokazali da dolazi do poboljšanja svojstava penjenja hidrolizata ribljih proteina i hidrolizata proteina surutke [401,404]. U poređenju sa rezultatima druge grupe autora koji su došli do zaključka da je kapacitet pene hidrolizata proteina iz jaja ribe meriga, dobijenih pomoću alkalaze i papaina iznosio 70% i 25%, redom, u ovom radu, postignute su značajno veće vrednosti (80,72% i 67,75%) i to posebno za hidrolizate dobijene pomoću papaina [229]. Ostvareni bolji rezultati, u poređenju sa literaturnim, mogu se pripisati uticaju ultrazvučnog pretretmana pre reakcije hidrolize proteina belanceta.

Uticaj dužine pretretmana UZS-20kHz na emulgujuća svojstva hidrolizata pripremljenih pomoću alkalaze i papaina prikazana je na Slici 7.26. Rezultati su dati u vidu indeksa aktivnosti emulzije (*IAE*) i indeksa stabilnosti emulzija (*ISE*). Aktivnost stvaranja proteinskih emulzija predstavlja sposobnost proteina da učestvuje u procesu stvaranja emulzije, a *IAE* je veličina površine međufaze ulje-voda koju može stabilisati jedan gram proteina, dok *ISE* predstavlja vreme tokom kog protein može opstati na graničnoj površini ulje-voda i uticati na zadržavanje stabilnosti formirane emulzije [228,405].



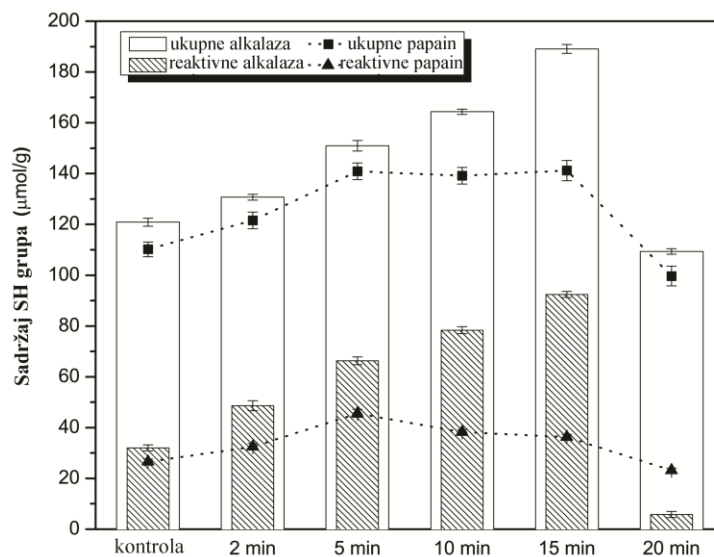
Slika 7.26. Uticaj dužine ultrazvučnog pretretmana na emulgujuća svojstva hidrolizata proteina belanceta dobijenih pomoću alkalaze (beli stubići) i papaina (obojeni stubići) (Pretretman: 20kHz, 2-20 min, 25 °C; Uslovi hidrolize: 50 °C, pH 8, maseni odnos E/S 2:81, 10% -tni vodeni rastvor belanceta)

Sa dijagrama se jasno vidi da je ultrazvučni pretretman uticao na povećanje *IAE* i *ISE* svih hidrolizata u ispitivanim vremenskim intervalima pretretmana od 2-15 min. Produženo izlaganje ultrazvučnim talasima (20 min) je nepovoljno uticalo na emulgujuća svojstva hidrolizata dobijenih pomoću papaina, dok hidrolizati dobijeni alkalazom nisu pokazali značajnu ($p < 0,05$) razliku u poređenju sa kontrolom (hidroliza bez pretretmana). Bolja emulgujuća svojstva zabeležena su kod hidrolizata dobijenih alkalazom, nego papainom. Maksimalne vrednosti *IAE* i *ISE* hidrolizata dobijenih dejstvom alkalaze postignute su nakon 15 min pretretmana i iznosile su 169,9 m²/g i 172,37 h, redom, dok su maksimalne vrednosti za hidrolizate papaina ostvarene nakon 5 min ultrazvučnog pretretmana i dobijene su vrednosti od 153,16 m²/g i 71,78 h, za *IAE* i *ISE*, redom. Na osnovu ovog podatka, može se zaključiti da je izbor enzima veoma bitan, jer je hidroliza izvedena pomoću različitih proteaza dala značajno drugačije rezultate. U literaturi postoje navode da hidrolizati pokazuju bolja emulgujuća svojstva usled veće izloženosti hidrofobnih aminokiselinskih ostataka na površini molekula proteina, ali je bitno napomenuti da to zavisi od veličine proteinskih lanaca. Za emulgujuću aktivnosti i sposobnost migracije proteina na graničnu površinu ulje-voda, potrebni su proteinski lanci čija je molekulska masa veća od 10 kDa, jer oni bolje doprinose stvaranju emulzija, nego lanci manje molekulske mase. Kao posledica

dejstva ultrazvučnih talasa i proteaza, došlo je do fragmentacije lanaca proteina belanceta na peptide i lance manje molekulske mase (oligopeptide), koji su dodatno doprineli sposobnosti formiranja emulzija i uticali na stabilnost filma na graničnoj površini ulje-voda, čime je omogućeno bolje usmeravanje hidrofilnih, odnosno hidrofobnih delova molekula unutar emulzije na granici ulje-voda. Na graničnoj površini ulje-voda došlo je do orijentacije lipofilnih delova molekula proteina ka uljanoj fazi, dok su hidrofilni delovi bili orijentisani ka vodenoj fazi, što je za posledicu imalo redukciju površinskog napona na graničnom sloju. Iz rezultata se može zaključiti da se nakon pretretmana UZS-20kHz proteini/peptidi više „odmotavaju“ i hidrofobni regioni postaju više dostupni, pa je usled toga olakšana bolja orijentacija ka graničnom sloju koja je uticala na unapređenje emulgujućih svojstava hidrolizata. Povećana hidrofobnost je i razlog velike stabilnosti emulzija hidrolizata, jer hidrofobne interakcije imaju značajnu ulogu prilikom obrazovanja adsorpcionog sloja na granici faza čija jačina zavisi od međusobnih interakcija (hidrofobne i elektrostatičke interakcije) molekula proteina i kapljica ulja. Što je više proteina adsorbovano na graničnoj površini, to je manja mogućnost da dođe do međusobnog spajanja kapljica ulja koje doprinosi kolapsu strukture emulzije [406-408].

Što se tiče literaturnih podataka, može se reći da su oni veoma kontradiktorni. Neki autori su došli do zaključka da enzimaska hidroliza dovodi do poboljšanja emulgujućih svojstava proteina, dok su drugi istraživači bili mišljenja da enzimaska hidroliza utiče na narušavanje emulgujućih svojstava proteina [174,409,410]. Generalno, tumačenjem rezultata dobijenih u okviru ovog istraživanja primećeno je dobro slaganje između rezultata rastvorljivosti (Slika 7.24), emulgujućih svojstva i hidrofobnosti hidrolizata (Slika 7.28) i rezultati su u skladu sa zapažanjima do kojih su došli neki autori [402].

Jedan od prvih nagoveštaja promene strukture proteina jeste promena sadržaja sulfhidrilnih grupa (*SH*). Glavna uloga sulfhidrilnih grupa ogleda se u održavanju stabilne trodimenzionalne strukture proteina, te je uticaj ultrazvučnog pretretmana i enzimske hidrolize na funkcionalnost ispitana i određivanjem sadržaja sulfhidrilnih grupa hidrolizata. Rezultati ukupnih i reaktivnih sulfhidrilnih grupa prikazani su na Slici 7.27.



Slika 7.27. Uticaj dužine ultrazvučnog pretretmana na sadržaj sulfhidrilnih grupa hidrolizata proteina belanceta dobijenih pomoću alkalaze i papaina (Pretretman: 20kHz, 2-20 min, 25 °C; Uslovi hidrolize: 50 °C, pH 8, maseni odnos E/S odnos 2:81, 10% -tni vodeni rastvor belanceta)

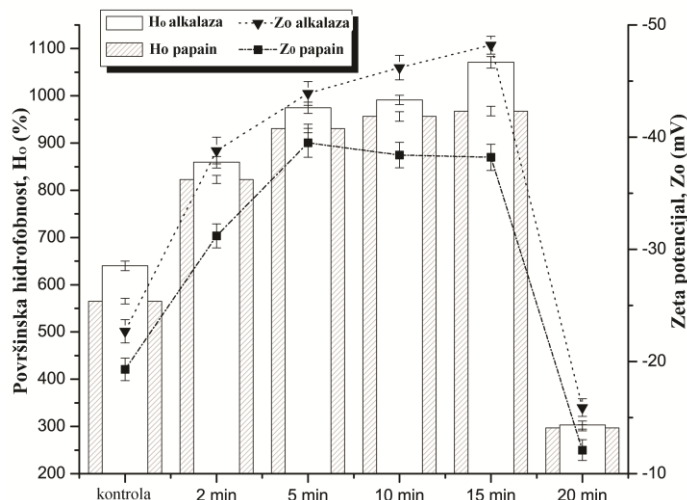
Sadržaj ukupnih i reaktivnih *SH* grupa svih hidrolizata ispitanih u funkciji vremena pretretmana pokazao je značajan ($p < 0,05$) porast u prvih 15 min pretretmana, dok je nakon 20 min ultrazvučnog pretretmana došlo da pada ukupnih i reaktivnih *SH* grupa u poređenju sa kontrolom (hidroliza bez pretretmana). Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da je pretretman UZS-20kHz doveo do određenog stepena odmotavanja proteina, što je u saglasnosti sa rezultatima poboljšane rastvorljivosti i emulgujućih svojstava hidrolizata (Slika 7.24 i 7.26). Ako se uzme u obzir izbor enzima, jasno je da su hidrolizati dobijeni dejstvom alkalaze pokazali veći sadržaj *SH* grupa u poređenju sa hidrolizatima papaina. Zabeleženi trend rasta ukupnih i reaktivnih *SH* grupa sa vremenom pretretmana je identičan za sve hidrolizate, nezavisno od vrste enzima, ali je pri različitim vremenima ultrazvučnog pretretmana ostvaren najveći prinos. Hidrolizat dobijen pomoću alkalaze nakon 15 min pretretmana UZS-20kHz pokazao je najveći stepen odmotavanja proteina, praćen najvećim sadržajem *SH* grupa, dok je hidrolizat dobijen pomoću papaina dao najveće vrednosti nakon 5 min pretretmana. U odnosu na kontrolu, ostvaren je porast ukupnih i reaktivnih grupa od 58,2 i 205,8 i 26,4 i 70,4% za alkalazu i papain, redom. Rezultati pokazuju da se uzajamnim dejstvom ultrazvučnog pretretmana i naknadnom enzimskom hidrolizom

proteina belanceta različitim enzimima može podstaći proteolitičko „cepanje“ postojećih proteinskih agregata tako što se smanjuje broj disulfidnih veza, koje su odgovorne za očuvanje strukture agregata. Naime, u vremenskom periodu soniciranja od 2-15 min, postignuta je najveća denaturacija hidrolizata koja je dovela do povećanog izlaganja *SH* grupa iz unutrašnjosti molekula proteina, usled otvaranja proteinskih globula dejstvom ultrazvučnih talasa. Već nakon 20 min pretretmana UZS-20kHz, zabeležen je smanjen sadržaj sulfhidrilnih grupa, što može biti posledica ponovnog formiranja intermolekulskih disulfidnih veza usled oksidacije sulfhidrilnih grupa izazvane dejstvom nastalih slobodnih radikala tokom soniciranja. Pretpostavlja se da je obrazovanje disulfidnih veza dovelo do ponovnog zatvaranja molekula i formiranja agregata.

Pregledom literature, ustanovljeno je da ima mnogo kontradiktornih izveštaja. Nasuprot rezultatima dobijenim u ovom istraživanju, Dao (Zhao) i sar. (2011) i Šuroka (Surówska) i sar. (2004) su utvrdili smanjen sadržaj ukupnih/reaktivnih sulfhidrilnih grupa nakon hidrolize proteina kikirikija i proteina koncentrata soje pomoću alkalaze [411,412]. Takođe, Gribi (Ghribi) i sar. (2015) su došli do zaključka da je enzimaska hidroliza izolata proteina leblebija pomoću alkalaze uticala na smanjen sadržaj sulfhidrilnih grupa [413]. Slično rezultatima dobijenim u okviru ove teze, Lei i sar. (2011) su ustanovili značajan porast ukupnih *SH* grupa nakon hidrolize ultrazvučno pretretiranog rastvora ovotransferina termolizinom [322]. Zabeležen je porast ukupnih *SH* grupa sa vremenom pretretmana do 30 i 60 sekundi pri frekvenci ultrazvučnih talasa od 20 i 60 kHz, nakon čega je došlo do smanjenja sadržaja ukupnih *SH* grupa. Iz svega navedenog, može se zaključiti da je uticaj ultrazvučnog pretretmana na proteine veoma kompleksan i da zavisi od uslova izvođenja samog pretretmana, kao i od vrste proteina koji se izlažu dejstvu ultrazvuka (prečišćen protein ili smeša proteina).

7.10.3. Uticaj dužine pretretmana UZS-20kHz i vrste enzima na površinske karakteristike hidrolizata proteina belanceta

Kao preduslov za zadovoljavajuću površinsku aktivnost, proteini treba da poseduju naelektrisanje i hidrofobnu površinu. Dijagram zeta potencijala (Z_0) i površinske hidrofobnosti (H_0) hidrolizata dobijenih pomoću alkalaze i papaina, u funkciji vremena pretretmana UZS-20kHz, predstavljen je na Slici 7.28.



Slika 7.28. Uticaj dužine ultrazvučnog pretretmana na površinsku hidrofobnost (H_o) i zeta potencijal (Z_o) hidrolizata proteina belanceta dobijenih pomoću alkalaze i papaina (Pretretman: 20kHz, 2-20 min, 25 °C; Uslovi hidrolize: 50 °C, pH 8, maseni odnos E/S 2:81, 10% -tni vodeni rastvor belanceta)

Kao što se može primetiti, obe veličine su značajno ($p < 0,05$) unapređenje nakon ultrazvučnog pretretmana proteina belanceta i naknadne hidrolize pomoću alkalaze i papaina. Najbolji rezultati dobijeni su nakon 15 i 5 min ultrazvučnog pretretmana za hidrolizat alkalaze i papaina, redom. Nakon hidrolize alkalazom, ostvarena je veća hidrofobnost u vremenskim intervalima od 2-15 min, dok kod hidrolizata papaina nije primećen statistički značajan ($p > 0,05$) porast H_o sa vremenom ultrazvučnog pretretmana.

Ovakav rezultat je posledica veće specifičnosti alkalaze ka peptidnim vezama, pa se može pretpostaviti da je veća H_o detektovana zbog hidrolize peptidnih veza čiji se karboksilni kraj sastoji od hidrofobnih aminokiselinskih ostataka, kao što su tirozin, leucin i valin [414]. Alkalaza ima veliku specifičnost ka hidrolizi peptidnih veza formiranih između glicina i histidina, serina i histidina, leucina i tirozina i triptofana i tirozina [415]. U poređenju sa hidrolizatima dobijenih pomoću papaina, kod onih dobijenih pomoću alkalaze, uočena je veća ekspozicija aromatičnih aminokiselina na površini molekula proteina, kao i veća fleksibilnost molekula.

Takođe, objašnjenje za povećanu površinsku hidrofobnost svih hidrolizata bi trebalo potražiti u činjenici da je usled kavitacije došlo do smanjenja međumolekulskih interakcija koje su uticale na reorganizaciju hidrofobnih regiona lociranih u unutrašnjosti molekula

proteina. Povećan je broj hidrofobnih grupa na površini molekula i na taj način je olakšana pristupačnost enzima peptidnim vezama u čiji sastav ulaze hidrofobne aminokiseline. Ovi rezultati mogu poslužiti i kao objašnjenje za povećanu emulgujuću sposobnost ultrazvučno pretretiranih hidrolizata (Slika 7.26) dobijenih pomoću alkalaze i papaina, jer je pokazano da je odmotavanje molekula proteina izazavano ultrazvučnim talasima dovelo do oslobađanja hidrofobnih aminokiselina tokom enzimske hidrolize koje se mogu smatrati odgovornim za povećanje indeksa aktivnosti emulzija i indeksa stabilnosti emulzija.

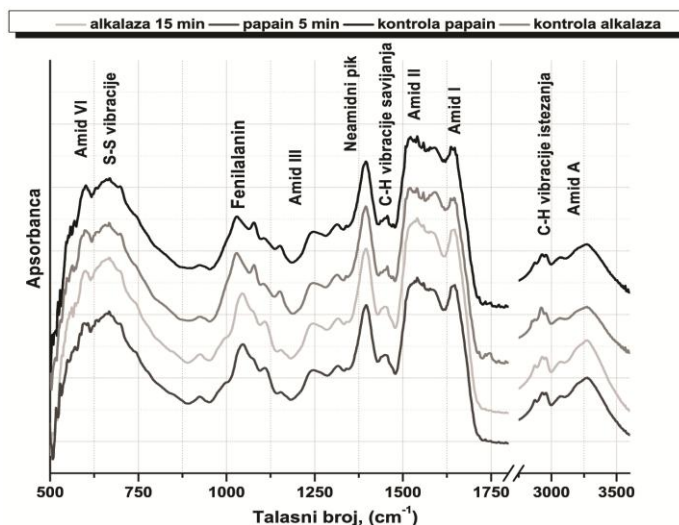
Pregledom literature, ustanovljeno je da površinska hidrofobnost proteina zavisi od eksperimentalnih uslova (pretretman, hidroliza), karakteristika samih proteina (izvor, aminokiselinski sastav) i specifičnosti enzima i da može doći do povećanja ili smanjenja H_o nakon enzimske hidrolize [416]. Na primer, kontrolisana enzimska hidroliza proteina pasulja *Vicia faba L.* pomoću tripsina i izolata proteina soje pomoću pankreatina uticala je na povećanje H_o , što je objašnjeno delimičnom promenom konformacije proteina i oslobađanjem malih polipeptida ili peptida u rastvor. Kod oba supstrata, došlo je do izlaganja većeg broja hidrofobnih amino grupa iz unutrašnjosti molekula na površinu molekula, što je uticalo na povećanje površinske hidrofobnosti [417,418]. Nasuprot ovim rezultatima, drugi autori su došli do saznanja da kontrolisana enzimska hidroliza negativno utiče na površinsku hidrofobnost dobijenih hidrolizata proteina. Smanjenje H_o primećeno je nakon hidrolize sojinog brašna tripsinom, nakon hidrolize izolata proteina soje bromelinom, nakon hidrolize ekstrudiranog sojinog koncentrata alkalazom i esperazom, kao i nakon hidrolize koncentrata proteina pivskog tropa alkalazom [412,419-421]. Jung i sar. (2005) su pretpostavili da je smanjenje H_o posledica agregacije izloženih hidrofobnih grupa (putem hidrofobnih interakcija) koja je dovela do promene konformacije molekula i premeštanja hidrofobnih grupa sa površine molekula u unutrašnjost novonastalih agregata [419]. Nasuprot pretpostavkama Jung i sar. (2005), Šuroka i sar. (2004) smatraju da delimično razvijanje proteina i oslobađanje polipeptida/peptida nakon enzimske hidrolize utiče na izmene molekula proteina, tako da dolazi do povećanja konformacione entropije i zauzimanje takve konformacije proteina za koju je karakteristično prisustvo hidrofilnih regiona na površini molekula [412,419].

Što se tiče površinskog naelektrisanja, dobijene su negativne vrednosti zeta potencijala (Z_o) nakon hidrolize enzimima alkalazom i papainom, sugerišući da su se stabilnost i

elektrokinetički potencijal hidrolizata održali stabilnim nakon ultrazvučnog pretretmana. Ovi rezultati se mogu dovesti u vezu sa ostvarenom povećanom rastvorljivošću (Slika 7.24) i sadržajem sulfhidrilnih grupa (Slika 7.27). Posmatrajući sinergistički efekat ultrazvučnog pretretmana i specifičnosti enzima, mogu se konstatovati značajne ($p < 0,05$) razlike u dobijenim vrednostima zeta potencijala hidrolizata. Prikazani rezultati su u saglasnosti sa prethodnim rezultatima (Slika 7.23) gde je pokazano da je pretretman UZS-20kHz značajno unapredio enzimsku hidrolizu proteina belanceta katalizovanu alkalazom i papainom. Povećanje stepena hidrolize uticalo je na povećanje površinskog naelektrisanja molekula proteina belanceta, što je u skladu sa rezultatima objavljenim od strane Liu i sar. (2014) [401].

7.10.4. FTIR analiza hidrolizata dobijenih pomoću alkalaze i papaina

FTIR analiza je sprovedena kako bi se detaljnije ispitale eventualne razlike unutar sekundarne strukture ultrazvučno pretretiranih i hidrolizovanih proteina belanceta dobijenih pomoću alkalaze i papaina. Analizirani su uzorci koji su dali najveći stepen hidrolize, a to su hidrolizat dobijen pomoću alkalaze pretretiran UZS-20kHz tokom 15 min i hidrolizat dobijen dejstvom papaina pretretiran UZS-20kHz tokom 5 min. FTIR spektar u opsegu talasnih brojeva od 500-3500 cm^{-1} predstavljen je na Slici 7.29.



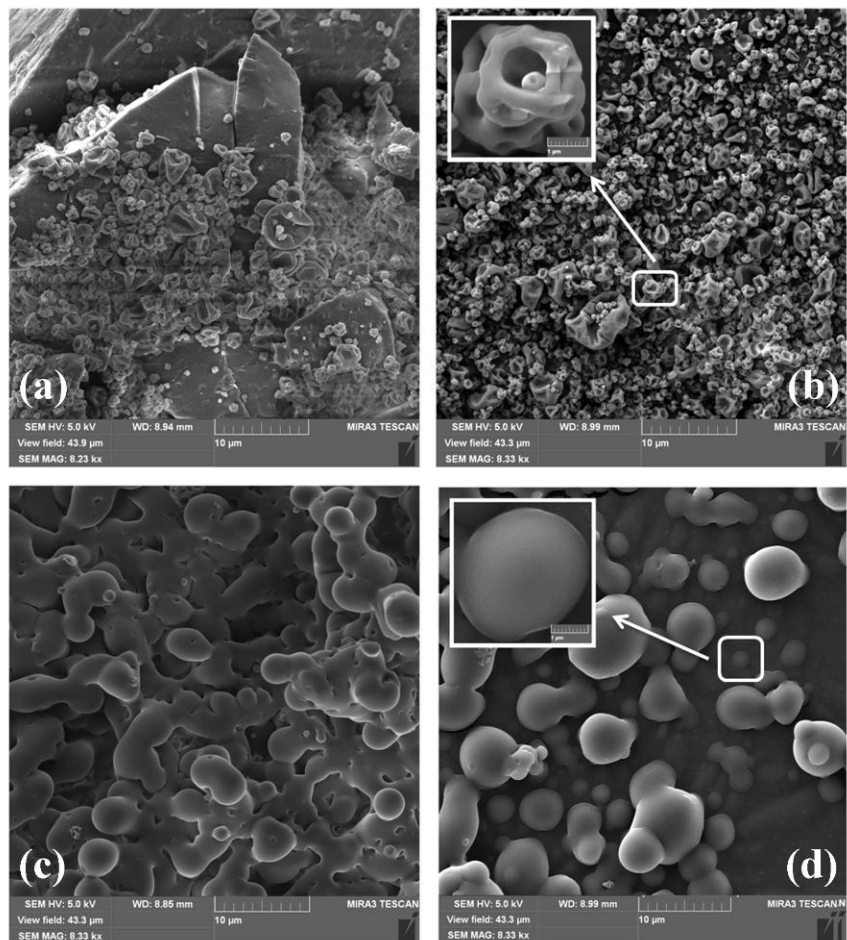
Slika 7.29. FTIR spektar hidrolizata proteina belanceta dobijenih pomoću alkalaze i papaina, koji su pre hidrolize bili tretirani ultrazvukom ili nisu bili tretirani ultrazvukom (Pretretman: 20kHz, 15 min, 25 °C; Uslovi hidrolize: 50 °C, pH 8, maseni odnos E/S 2:81, 10% -tni vodeni rastvor belanceta)

Apsorpcioni pik u opsegu talasnih brojeva od 3100-3500 cm^{-1} (Amid A) koji se pripisuje N-H i O-H vibracijama istezanja hidroksilnih grupa je nakon pretretmana UZS-20 kHz promenio oblik i intenzitet usled interakcije O-H vibracija istezanja molekula vode i N-H istezanja izazvanog enzimskom hidrolizom proteina belanceta. Ultrazvučni pretretman je doveo do promena u intenzitetu vibracija istezanja C-H₂, C-H i =C-H veza na talasnim brojevima 1450, 1456, 2933 i 3060 cm^{-1} što se može dovesti u vezu sa hidrofobnim interakcijama i konformacionim promenama molekula izazvanim dejstvom ultrazvučnih talasa. U poređenju sa kontrolnim hidrolizatima, izraženija apsorpciona traka oba hidrolizata primećena je na talasnim brojevima od 1300-1700 cm^{-1} koje odgovaraju Amid I i Amid II regionu, što će reći da je došlo do strukturnih promena unutar amidne veze. Kod oba hidrolizata, primećen je gubitak pika na 1516 cm^{-1} u poređenju sa kontrolama (hidrolize bez pretretmana). Na ovom talasnom broju javlja se pik koji potiče od vibracija istezanja aromatičnog prstena tirozina [422,423]. Odsustvo ovog pika na 1516 cm^{-1} je posledica promene mikrookoline ostataka tirozina koja se manifestovala promenom tercijarne i sekundarne strukture proteina belanceta pre hidrolize. Karakteristični pikovi na talasnim brojevima od 1550-1585 cm^{-1} potiču od COO⁻ vibracija istezanja karboksilnog kraja asparaginske i glutaminske kiseline, a njihov smanjen intenzitet kod oba hidrolizata, u poređenju sa kontrolom, je posledica konformacionih promena proteina izazvanih dejstvom ultrazvučnih talasa [424,425]. Na talasnoj dužini od 1620 cm^{-1} detektovani su pikovi manjeg intenziteta za oba hidrolizata. Ovo može biti posledica razaranja proteinskih agregata nakon ultrazvučnog pretretmana, koje se ogleda malim udelom strukture β -naboranog lista unutar hidrolizata [426]. Takođe, primećeno je povećanje intenziteta pika na 1651 cm^{-1} kod hidrolizata dobijenih iz pretretiranih proteina, u poređenju sa kontrolom. Ovo povećanje intenziteta pika je ujedno i potvrda postojanja određenog udela α -zavojnice unutar strukture hidrolizata [427]. Što se tiče Amid III regiona (1229-1301 cm^{-1}), nisu detektovane bitne promene. Neophodno je istaći da je zabeležen smanjen intenzitet pika unutar Amid VI regiona na 560 cm^{-1} za oba hidrolizata, u odnosu na kontrolu. Na ovoj talasnoj dužini detektuju se vibracije S-S veza, pa se može tvrditi da je došlo do smanjenja broja disulfidnih veza nakon pretretmana UZS-20kHz. Ovo zapažanje potvrđuje ranije iznetu tvrdnju da je ultrazvučni pretretman uticao na povećanje sadržaja sulfhidrilnih grupa u molekulu proteina, pa samim tim i kod hidrolizata (Slika 7.27).

Uopšteno govoreći, može se zaključiti da je ultrazvučni pretretman doveo do raskidanja interakcija između susednih aminokiselinskih lanaca, kao i između različitih delova molekula proteina i na ovaj način uticao na razmotavanje molekula proteina belanceta formirajući manje uređenu strukturu. Na osnovu ovih činjenica, može se zaključiti da su funkcionalnost hidrolizata i njihova struktura veoma povezani i da su unapređena funkcionalna svojstva direktna posledica promene strukture proteina belanceta izazvane ultrazvučnim talasima visoke frekvence, čiji je uticaj delimično zadržan i nakon enzimske hidrolize. Međutim, kako dolazi do raskidanja peptidnih veza u molekulu pod dejstvom enzima u toku hidrolize, naravno da se može govoriti samo o kombinovanom uticaju ultrazvuka i enzima, zbog čega je i vršeno poređenje sa kontrolom (hidrolizat dobijen samo osled dejstva enzima).

7.10.5. FE-SEM analiza hidrolizata dobijenih pomoću alkalaze i papaina

Kako bi se ispitaio uticaj mikrostrukture hidrolizata, koji su dobijeni iz proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnim talasima frekvence 20 kHz pre hidrolize, na funkcionalna svojstva dobijenih hidrolizata, morfologija hidrolizata je okarakterisana pomoću metode skenirajuće elektronske mikroskopije sa emisijom polja (*na engl.* Field Emission Scanning Electron Microscope, FE-SEM). Analizirani su uzorci koji su dali najveći stepene hidrolize, a to su hidrolizat dobijen pomoću alkalaze pretretiran UZS-20kHz tokom 15 min i hidrolizat dobijen dejstvom papaina pretretiran UZS-20kHz tokom 5 min. Uzorci su osušeni tehnikom sprej sušenja na način opisan u metodi 6.3.15, a FE-SEM mikrografije spršenih hidrolizata prikazane su na Slici 7.30.



Slika 7.30. FE-SEM mikrografije (uvećanje $\times 8,33$ k, razmera = $10 \mu\text{m}$) hidrolizata dobijenog pomoću alkalaze iz nativnih proteina belanceta (a), hidrolizata dobijenog pomoću alkalaze iz prethodno pretretiranih proteina ultrazvukom (b), hidrolizata dobijenog pomoću papaina iz nativnih proteina belanceta (c) i hidrolizata dobijenog pomoću papaina iz prethodno pretretiranih proteina ultrazvukom (d) (Pretretman: 20kHz, 15 min, $25 \text{ }^\circ\text{C}$; Uslovi hidrolize: $50 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 8, maseni odnos E/S 2:81, 10%-tni vodeni rastvor belanceta)

Dobijeni rezultati pokazuju da je morfologija čestica hidrolizata dobijenih pomoću alkalaze i papaina iz ultrazvučno pretretiranih proteina potpuno drugačija. Ustanovljeno je da je pretretman UZS-20kHz drastično uticao na promene površinske morfologije čestica hidrolizata, u poređenju sa hidrolizatima dobijenih iz proteina koji nisu bili podvrgnuti dejstvu ultrazvučnih talasa pre same reakcije hidrolize. Kao što se može i videti na Slici 7.30a, primećeno je postojanje velikih proteinskih agregata kod netretiranih hidrolizata

dobijenih pomoću alkalaze (kontrola). Nasuprot ovom zapažanju, morfologija čestica istog hidrolizata, pretretiranog UZS-20kHz, značajno je promjenjena i uočena je pojava manjih sub-jedinica (Slika 7.30b) čime je potpuno reorganizovana struktura dobijenog hidrolizata. Dobijene su sferne čestice sa karakterističnim šupljinama. Sličnu morfologiju čestica detektovali su Čen (Chen) i sar. (2012), ali nakon hidrolize proteina belanceta papainom [230]. U poređenju sa hidrolizatom dobijenim dejstvom alkalaze, kod hidrolizata dobijenog pomoću papaina, nisu primećene pore unutar čestica (Slika 7.30d). Tokom ultrazvučnog pretretmana došlo je do razaranja međusobno povezanih strukturnih entiteta (Slika 7.30c) i obrazovanja zasebnih sfernih sub-jedinica na kojima nije primećeno postojanje šupljina. Slična morfologija uočena je kod hidrolizata zeina, proteina kukuruza, dobijenog pomoću alkalaze u slučaju kad je zein i pretretiran ultrazvučnim talasima [428]. U poređenju sa literaturnim podacima, dobijeni su obrnuti rezultati, ako se uzme u obzir samo izbor enzima. U okviru ove disertacije, hidrolizati dobijeni pomoću papaina i pretretirani UZS-20kHz pokazali su istu morfologiju kao hidrolizati zeina, proteina kukuruza, dobijeni dejstvom alkalaze, koje su ispitali Đin (Jin) i sar. (2015). Razlike u rezultatima mogu se pripisati vrsti primenjenog ultrazvučnog pretretmana, različitim svojstvima proteina i različitim tehnikama sušenja (hidrolizat zeina je sušen tehnikom zamrzavanja).

Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da je ultrazvučni pretretman uticao na sprečavanje agregacije proteina belanceta raskidanjem disulfidnih veza, vodoničnih veza i kovalentnih i/ili nekovalentnih veza. Na ovaj način olakšana je naknadna enzimaska hidroliza, zahvaljujući dostupnosti većeg broja aktivnih mesta (iz unutrašnjosti molekula) koja su doprinela efikasnijem vezivanju alkalaze i papaina. Postoje brojni radovi u literaturi koji, takođe, ukazuju na to da ultrazvučni pretretman utiče na promenu morfologije čestica smanjenjem njihove veličine [155,157,174,429]. Za razliku od ovih saznanja, Statopulos (Stathopoulos) i sar. (2004) su došli do zaključka da sonikacija proteina uzrokuje formiranje agregata proteina [430].

Detektovane promene mikrostrukture su u saglasnosti sa prethodno urađenim analizama, gde je ustanovljeno da je došlo do promene sekundarne strukture hidrolizata, povećanja površinske hidrofobnosti i sadržaja sulfhidrilnih grupa, pa se može potvrditi hipoteza da ultrazvučni pretretman dovodi do razaranja veza odgovornih za održavanje stabilne strukture proteina dovodeći do fragmentacije agregata. Ovo razaranje je posledica

formiranja lokalnih zona sa visokom temperaturom nakon implozije mehurova (kavitacija), turbulentnog kretanja tečnosti i veoma jakih sila smicanja nastalih usled udarnih ultrazvučnih talasa [105,431].

7.11. KARAKTERIZACIJA DOBIJENIH HIDROLIZATA NAKON POSTHIDROLITIČKIH TEHNOLOŠKIH POSTUPAKA

Dosadašnji rezultati dobijeni tokom rada na ovoj doktorskoj disertaciji dali su objašnjenje mehanizma delovanja ultrazvučnih talasa na strukturu proteina belanceta i njihovu korelaciju sa funkcionalnim svojstvima. Primenom različitih ultrazvučnih uređaja, sa opsegom frekvenci od 20-40 kHz, kao i variranjem uslova izvođenja samog pretretmana (snaga ultrazvučnih talasa, dužina trajanja pretretmana, radna temperatura) pokušalo se da se doprinese objašnjenju promene strukture proteina belanceta nastale usled kavitacionog dejstva ultrazvučnih talasa, formiranja/razlaganja agregata proteina, kao i promene morfologije i veličine čestica pretretiranih proteina belanceta i njihovih hidrolizata. Sinergistički efekat ultrazvučnog pretretmana i naknadne enzimske hidrolize detaljno je razmatran, kao i njihov zajednički uticaj na poboljšana funkcionalna svojstva hidrolizata. Dobijeni rezultati mogu se smatrati valjanim prilikom uvođenja novih tehnoloških postupaka proizvodnje hidrolizata proteina belanceta, sa svrhom poboljšanja njihovih funkcionalnih, nutritivnih i organoleptičkih svojstava.

Na osnovu svega do sada navedenog, poslednji deo ove doktorske disertacije posvećen je dobijanju hidrolizata u formi praha u cilju njihovog lakšeg lagerovanja i povećanja stabilnosti tokom skladištenja i čuvanja. Optimizovan je proces sušenja različitim postupcima i dobijeni prahovi su okarakterisani sa aspekta organoleptičkih, funkcionalnih i fizičko-hemijskih svojstava. Posebna pažnja bila je usmerena na očuvanje tehnološko-funkcionalnih svojstava dobijenih hidrolizata tokom sušenja, jer je upravo čitav enzimski proces, koji je prethodio sušenju, optimizovan sa tog aspekta. Glavni cilj bio je da se ispita mogućnost dobijanja najmanje jednog novog proizvoda na bazi hidrolizata proteina belanceta, i to u praškastom obliku, koji bi posedovao željena tehnološko-funkcionalna svojstva (rastvorljivost, svarljivost, ukus).

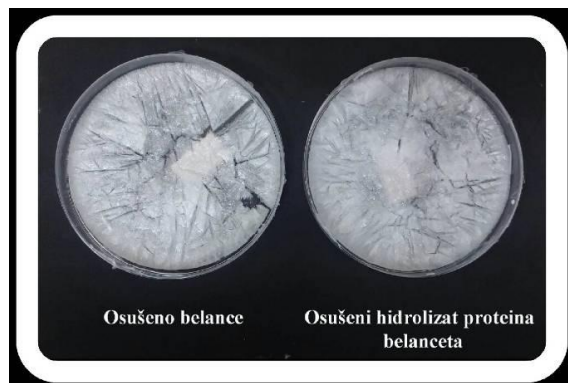
7.11.1. Optimizacija i izbor tehnike sušenja ultrazvučno pretretiranih vodenih rastvora hidrolizata proteina belanceta

Sušenje uzorka u cilju dobijanja osušenog proizvoda sa zadržanim tehnološko-funkcionalnim karakteristikama, pogodnog za transport, korišćenje, odlaganje i dugotrajno skladištenje je jedna od najstarijih i najčešće korišćenih tehnoloških operacija. Danas se tehnološko različiti postupci sušenja koriste u skoro svim granama industrije. Pored unapred postavljenog zahteva u smislu svojstava i kvaliteta proizvoda, pri izboru odgovarajućeg načina sušenja mora se uzeti uobzir i njegova ekonomska i energetska efikasnost, kao i zahtevi tržišta. Poslednjih decenija došlo je do ekspanzije istraživanja novih postupaka sušenja i njihovog modelovanja, što potvrđuju brojni naučni radovi u specijalizovanim časopisima i međunarodni skupovi posvećeni isključivo problematici sušenja.

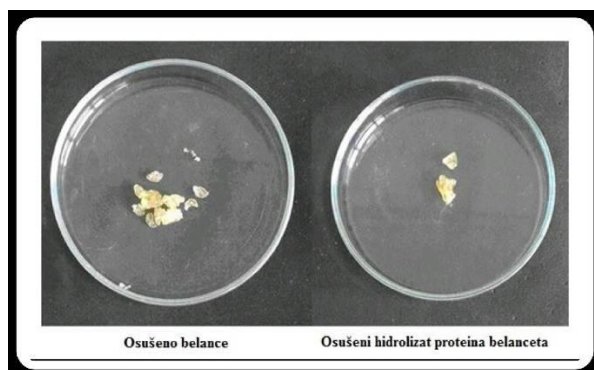
Osim dobijanja željenog krajnjeg proizvoda, koji bi pokazao dobru stabilnost tokom skladištenja, očuvanje stabilnosti proteina belanceta tokom procesa sušenja je jako bitno. Postoji nekoliko pogodnih tehnika koje mogu da se koriste za dobijanje stabilnih praškastih proteinskih formulacija. Najčešće korišćene tehnike su sušenje zamrzavanjem ili liofilizacija, gde dolazi do zamrzavanja rastvora proteina i sublimacije tečne faze pod vakuumom i sušenje raspršivanjem (sprej sušenje) koje se zasniva na aerosolizaciji rastvora proteina u struji toplog vazduha, prilikom čega dolazi do isparavanja vodene faze [432,433].

Faktori koji utiču na kvalitet osušenog proizvoda su: sastav sirovine, tehnika i procesni parametri sušenja, fizičko-hemijske osobine hidrolizata, vrsta biokatalizatora korišćena u toku enzimske reakcije dobijanja hidrolizata, kao i promena komponente u toku tehnološkog procesa proizvodnje hidrolizata (dodavanje baze u cilju održavanja konstantne pH reakcionog medijuma / odsustvo baze). Kako bi se ispitaio uticaj svih ovih parametara na svojstva osušenog proizvoda, finalna faza pripreme funkcionalnih dijetetskih suplemenata hidrolizata izvedena je pomoću dve različite tehnike sušenja : sprej sušenja i liofilizacije. Tokom optimizacije procesa sprej sušenja, ispitan je uticaj ulazne (110-180 °C) i izlazne temperature (65-100 °C) na željene karakteristike hidrolizata pripremljenih pri usvojenim procesnim parametrima ultrazvučnog preteretmana i hidrolize. Liofilizacija je vršena pri konstantnim procesnim parametrima datim u metodi 6.3.15.

Hidrolizat, koji je dobijen pod optimalnim uslovima (jednostepeni proces sa alkalazom) i koji je pokazao najbolja funkcionalna svojstva, podvrgnut je sušenju liofilizacijom i sprej sušenju. Na Slici 7.31 prikazani su dobijeni proizvodi osušeni liofilizacijom i to osušeni rastvor hidrolizovanog belanceta (dva uzorka desno) i kontrole (osušeno belance, levo), dok su na Slici 7.32 dati isti uzorci dobijeni tehnikom sprej sušenja.



Slika 7.31. Belance i hidrolizat proteina belanceta osušeni liofilizacijom (sušnica: Alpha 1-4 LSC plus, CHRIST) pod sledećim uslovima: uzorci su pre sušenja zamrznuti na -30°C u trajanju od 24 h (zamrznuti u staklenim Petrijevim kutijama u sloju debljine ~ 1 cm). Samo sušenje je vršeno pod sledećim uslovima: glavno sušenje 12 h na -30°C pri 0,25 mbar; finalno sušenje 5 h na 35°C pri 0,25 mbar). Svi uzorci su nakon sušenja smešteni u zatvorene sudove i čuvani na $\sim 4^{\circ}\text{C}$.



Slika 7.32. Hidrolizati proteina belanceta osušeni sprej sušenjem pod sledećim uslovima: ulazna temperatura: 150°C , izlazna temperatura 65°C , protok tečnosti 8,5 ml/min, protok komprimovanog vazduha za disperziju tečnosti 800 l/h

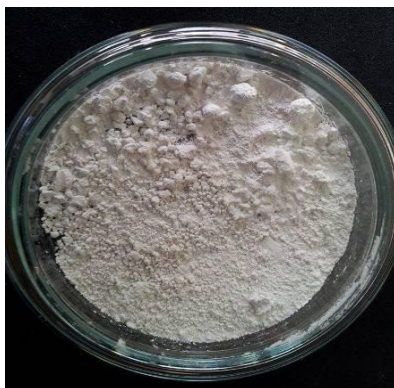
Kako ni u jednom slučaju nisu dobijeni fini prahovi hidrolizata, istraživanje je bilo usmereno na ispitivanje uticaja procesnih parametara pri sprej sušenju koji bi uticali na

dobijanje praha željene konzistencije. Ukoliko je protein nestabilan u rastvoru, on se obično suši liofilizacijom i prevodi u stabilniju formu. Međutim, kontrola ovog procesa je dosta složena, što dodatno usložnjava tehnološki proces i značajno poskupljuje cenu proizvoda. Zbog toga je pažnja bila usmerena na ispitivanje procesnih parametara tehnikom sprej sušenja. Varirana je ulazna temperatura sušenja u opsegu od 110-180 °C, a zatim i izlazna temperatura u opsegu od 65-100 °C. Međutim, poznato je da veličina i morfologija čestica zavise od uslova sušenja. Na primer, pri nižim protocima obično se dobijaju veće čestice praha sa većim sadržajem vlage, dok veći protoci utiču na smanjenje vodenih kapljica i nastanak čestica praha sa manjim sadržajem vlage, usled lakšeg uklanjanja molekula vode iz malih kapljica u toku sprej sušenja [434]. Imajući ovo u vidu, bilo je neophodno ispitati i uticaj protoka tečne faze, kao i protoka komprimovanog vazduha za disperziju tečnosti tokom sprej sušenja. Protok tečne faze variran je u intervalu od 4-8,5 ml/min, dok je protok komprimovanog vazduha za disperziju tečnosti variran u opsegu od 600-1050 l/h.

Usvojeni procesni parametri prikazani su u Tabeli 7.7, a izgled dobijenog praha hidrolizata dobijenih iz ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta osušenog pri optimalnim uslovima prikazan je na Slici 7.33.

Tabela 7.7. Usvojeni procesni parametri sprej sušenja

Uslovi sušenja
$T_{ul} = 180 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (ulazna temperatura)
$T_{izl} = 90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (izlazna temperatura)
Aspirator: 100%
Pumpa: 40 - 50%
Protok komprimovanog vazduha: 800 l/h
Protok tečnosti: 6 ml/min
Feed: 1
Nozzle cleaner (raspršivač): 6



Slika 7.33. Prah dobijen sprej sušenjem hidrolizata pri usvojenim procesnim parametrima.

Hidrolizat je dobijen enzimskom hidrolizom u jednostepenom procesu sa alkalazom pri čemu su proteini belanceta prethodno bili pretretirani ultrazvukom frekvence 40 kHz tokom 15 min

Pri usvojenim optimalnim uslovima, dobijen je finiji prah u poređenju sa dobijenim liofilizatom, kao i prahom dobijenim sprej sušenjem pri uslovima drugačijim od optimalnih (Slika 7.32.). Jasno se vidi razlika u formi ova dva praha, jer je pri optimalnim parametrima dobijen klasičan praškasti proizvod, dok je preliminarna faza ispitivanja pri uslovima drugačijim od optimalnih dala osušen proizvod u formi granula. Upravo zbog ove pojave bilo je neophodno izvršiti optimizaciju procesnih parametara sušenja, kako bi se dobio prah zadovoljavajuće konzistencije i granulacije, jer je pregledom literature utvrđeno da na izgled krajnjeg osušenog proizvoda utiču operativni parametri procesa sušenja, kao i fizičko-hemijska svojstva uzorka [435-437]. Kako je u oba slučaja korišćen isti uzorak, pretiran ultrazvukom frekvence 40 kHz tokom 15 min i hidolizovan alkalazom, jasno je da su uslovi sušenja odgovorni za dobijanje prahova različite forme. Uopšteno, može se zaključiti da protok komprimovanog vazduha nije imao uticaj na izgled dobijenog praha, dok su ulazna i izlazna temperatura pokazale značajan efekat na izgled finalnog proizvoda. Utvrđeno je da se pri većim ulaznim i izlaznim temperaturama dobija prah bolje granulacije i konzistencije. Iznenadjući rezultat je bio da se sprej sušenjem hidrolizata dobijenih iz ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta dobio prah karakteristične bele boje. Poznato je da termički pretretman belanceta na visokim temperaturama utiče na odvijanja složene Majlardove reakcije, a nastali proizvodi ove reakcije utiču na tamnjenje proizvoda, pa je žućkasta boja termički tretiranog belanceta jedan od glavnih problema za primenu prahova

na bazi proteina belanceta u prehrambenoj industriji. Kako bi se vizuelno i potvrdila ova činjenica, urađena je uporedna analiza sa hidrolizatom dobijenim pomoću alkalaze pod istim uslovima, ali sa termički pretretiranim proteinima belanceta (75 °C - 30 min) koji je osušen tehnikom sprej sušenja pri usvojenim optimalnim procesnim parametrima. Izgled dobijenog praha, upoređen je sa hidrolizatima koji su bili pretretirani ultrazvukom frekvence 40 i 20 kHz, a dobijeni rezultati su prikazani na Slici 7.34. Takođe, isti uzorci su osušeni i tehnikom liofilizacije, kako bi se eliminisao uticaj načina sušenja na dobijenu boju praha.



Slika 7.34. Fotografije osušenih hidrolizata liofilizacijom (gore) i sprej sušenjem (dole). Liofilizacija je vršena pri konstantnim usvojenim parametrima: glavno sušenje 12 h na -30 °C pri 0,25 mbar; finalno sušenje 5 h na 35 °C pri 0,25 mbar. Sprej sušenje je vršeno pri sledećim uslovima: T_{ul}/T_{izl} 180/90 °C, protok tečnosti 6 ml/min, protok komprimovanog vazduha za disperziju tečnosti 800 l/h. Hidrolizati su dobijeni enzimskom hidrolizom u jednostepenom procesu sa alkalazom pri čemu su izvorni proteini bili pretretirani sa tri različita pretretmana.

Slika 7.34. nam jasno govori da je moguće dizajnirati praškasti proizvod na bazi hidrolizata proteina belanceta u pogledu granulometrijskog sastava, izborom odgovarajućeg sistema za sušenje i optimalnih procesnih parametara. Sprej sušenje se pokazalo kao efikasnije, u poređenju sa liofilizacijom, mada u slučaju liofilizacije nije vršena optimizacija parametara sušenja. Još jedno moguće objašnjenje za bolje rezultate dobijene tehnikom sprej sušenja je da usled male veličine raspršenih kapi, kontaktna površina sa

agensom za sušenje se može smatrati velikom, što pogoduje intenzivnijem prenosu toplote i vlage i dobijanju sprášenog hidrolizata kome nije potrebna dorada naknadnim mlevenjem ili granulisanjem. Ovakav rezultat usmerio je tok daljeg istraživanja na ispitivanje uticaja ulazne temperature sprej sušenja, pri konstantnim ostalim uslovima (izlazna temperatura, $T_{iz} = 90 \text{ }^{\circ}\text{C}$, protok 6 ml/min), na neka osnovna svojstva praškastog proizvoda. Pri tome, uticaji sušenja su praćeni na prethodno analiziranim hidrolizatima dobijenim pomoću dva tehnološka procesa, prilikom čega su izabrani hidrolizati pretretirani termičkim pretretmanom (30 minuta na $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$) i ultrazvućnim pretretmanom (15 min, frekvencija 40 kHz). U oba slućajaja je izvršena jednostepena enzimská hidroliza sa alkalazom pri korišćenju 10%-tnog rastvora belanceta u šaržnom reaktoru sa mehanićkim mešanjem na $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i pri pH 8. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 7.8.

Lako se uoćava da sa porastom ulazne temperature usled zagrevanja uzorka dolazi do pogoršavanja boje praškastog proizvoda, ali i da se disperziono vreme i sadržaj vlage smanjuju gotovo linerano sa porastom temperature. Zbog toga, ulazna temperatura od $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$ je izabrana kao optimalna. Isto tako, ono što treba naglasiti je da je prah dobijen sušenjem ultrazvućno pretretiranog hidrolizata pokazao daleko bolja svojstva: veće indekse svetloće i kraće disperziono vreme što je u skladu sa vizuelno primećenim rezultatima prikazanim na Slici 7.34 i predstavlja veliki znaćaj za primenu proizvoda u prehrambenoj industriji. S aspekta boje i konzistencije dobijene osušene krajnje formulacije, hidrolizat pripremljen ultrazvućnim pretretmanom dao je prah sa najvećim intenzitom bele boje. Bela boja praha je od izuzetne važnosti, s obzirom da osušeno belance poseduje blago žutu boju što nije poželjno za implementaciju u dijetetskim suplementima.

Tabela 7.8. Fizičko-hemijska svojstva spraćenog hidrolizata proteina sprej sušenjem pri različitim ulaznim temperaturama i za dva različito pretretirana uzorka belanceta (ultrazvučno pri frekvenci od 40 kHz tokom 15 min i termički na 75 °C tokom 30 min)

	Ulazna temperatura, T_{ub} (°C)	Boja (L vrednost)	Rastvorljivost pri pH 6 (%)	Disperziono vreme (s)	Sadržaj vlage (%)*
Hidrolizat dobijen iz termički pretretiranih proteina	150	78,25±0,42	93,55±1,12	18,23±0,97	8,09±0,06
	160	76,57±1,25	92,01±1,09	18,04±1,03	6,04±0,01
	180	60,19±1,94	92,01±1,14	16,66±1,23	4,05±0,01
	200	66,24±0,01	90,22±0,97	14,26±0,99	3,02±0,02
Hidrolizat dobijen iz ultrazvučno pretretiranih proteina	150	90,23±0,94	89,30±0,91	7,69±0,93	8,09±0,06
	160	89,05±1,04	89,30±1,01	7,65±0,96	6,66±0,08
	180	84,72±2,17	89,30±0,87	7,47±0,94	3,78±0,04
	200	80,02±0,34	88,20±0,82	6,24±0,89	2,23±0,03
Kontrola (osušeni 10%-tni rastvor belanceta)	180	63,51±1,51	70,69±0,94	34,21±1,36	3,08±0,06

*određen Karl-Fišerovom metodom.

Kao zaključak, može se reći da su ultrazvučni pretretman i kontrolisana enzimaska hidroliza proteina belanca pozitivno uticali na ponašanje proizvoda pri sušenju i dobijanje praškastog proizvoda boljeg kvaliteta, u poređenju sa konvencionalnim termičkim pretretmanom proteina belanceta. Dobijeni rezultati predstavljaju osnovu za dalji razvoj poluindustrijskih i industrijskih sistema, a primenom postignutih rezultata u praksi omogućio bi se razvoj efikasnijih, ekonomičnijih, sigurnijih i ekološki prihvatljivijih tehnologija u odnosu na one koje se trenutno primenjuju u domaćoj industriji.

7.11.2. Karakterizacija praškastih hidrolizata sa aspekta funkcionalnih, organoleptičkih i senzornih svojstava

Različite tehnike sušenja mogu ireverzibilno denaturisati proteine i uticati na njihovu funkcionalnost nakon njihove re-hidratacije usled pojave agregacije i promene sekundarne strukture. Poznato je da, kada se proteini belanceta izlože temperaturama iznad 70 °C, dolazi do promene njihove sekundarne i tercijarne strukture, delimičnog i potpunog razmotavanja molekula, što dovodi do agregacije, denaturacije i gubitka njihove funkcionalnosti. Kako je u prethodnim fazama istraživanja optimizovan enzimski proces u pogledu dobijanja hidrolizata proteina belanceta poboljšanih funkcionalnih svojstava, u ovom delu istraživanja bilo je važno utvrditi da li su sprašeni hidrolizati nakon re-hidratacije zadržali dobru rastvorljivost i ostala funkcionalna svojstva. Kako je sprej sušenjem dobijen finiji, manje lepljiv i bolje rastvorljiv prah u poređenju sa dobijenim liofilizatom, sva naredna ispitivanja krajnjeg oblika hidrolizata vršena su sa prahovima dobijenim isključivo tehnikom sprej sušenja. Isto tako, u cilju provere kvaliteta finalnog proizvoda, ispitana su nutritivna svojstva i hemijski sastav proizvoda nakon sušenja, kao i funkcionalna svojstva dobijenih prahova. Takođe, određen je sadržaj pepela, lipida i proteina pomoću AOAC standardnih metoda.

Nakon ispitivanja funkcionalnih svojstava i ukusa hidrolizata dobijenih jednostepenom i dvostepenom enzimskom hidrolizom (odeljak 7.7.1, Tabela 7.4), ustanovljeno je da je većina hidrolizata imala gorak, slan i neprijatan ukus. Odsustvo gorčine je primećeno jedino kod hidrolizata dobijenog kombinacijom enzima alkalaza + flevorzim, ali je slan ukus zadržan. Kako bi dobijeni hidrolizati imali potencijalnu primenu u prehrambenoj industriji, poželjno je da imaju odgovarajući ukus i da se eliminiše njihova karakteristična gorčina i slan ukus. Primećen slan ukus hidrolizata je posledica dodavanja natrijum-hidroksida u toku reakcije hidrolize u cilju održavanja konstantne pH vrednosti u sistemu (pH-stat metoda). U tu svrhu, odabrani hidrolizati, koji su u dosadašnjim ispitivanjima pokazali najbolja funkcionalna svojstva, podvrgnuti su procesu odsoljavanja nakon enzimске hidrolize. Odsoljovanje je vršeno dijaliziranjem dobijenih hidrolizata, kako bi se smanjila količina soli ili eventualno skroz uklonila iz rastvora. Prečišćavanje proteina se uglavnom odvija tehnikom nanofiltracije ili putem gel-filtracione hromatografije, korišćenjem Sephadex™ punjenja za odsoljavanje, koje je izrazito skupo [438]. Kako bi

se smanjili ukupni troškovi proizvodnje hidrolizata proteina belanceta, izabrana je tehnika dijalize kao jeftina i pogodna za dobijanje hidrolizata željenih karakteristika, sa aspekta isplativosti tehnološkog procesa proizvodnje.

Pripremljeno je pet spršenih hidrolizata koji su dobijeni iz proteina belanceta primenom različitih pretretmana (termički ili ultrazvučni) i korišćenjem različitih proteaza u jednostepenom i dvostepenom procesu. Svi uzorci su dijalizirani nakon završene hidrolize i osušeni raspršivanjem na sprej drajeru pri usvojenim procesnim parametrima datim u Tabeli 7.7. Kao kontrola korišćen je 10%-tni vodeni rastvor belanceta spršen na isti način. Radi preglednosti uslovi hidrolize i pretretmana analiziranih uzoraka predstavljeni su tabelarno u Tabeli 7.9.

Tabela 7.9. Pregled uslova pod kojim su dobijeni hidrolizati i njihov stepen hidrolize

Uzorak	Uslovi hidrolize i pretretman	T _{ul} /T _{iz} , °C	SH (%)
HPB-1	20kHz-15min, alkalaza, dijaliza 24h	180 °C / 90 °C	39,01
HPB-2	40kHz-15min, alkalaza, dijaliza 24h	180 °C / 90 °C	31,87
HPB-3	75 °C-30min, alkalaza, dijaliza 24h	180 °C / 90 °C	18,93
HPB-4	20kHz-5min, papain, dijaliza, 24h	180 °C / 90 °C	36,5
HPB-5	40kHz-15min, alkalaza+flevorzim, dijaliza 24h	180 °C / 90 °C	28,23
Belance	/	180 °C / 90 °C	/

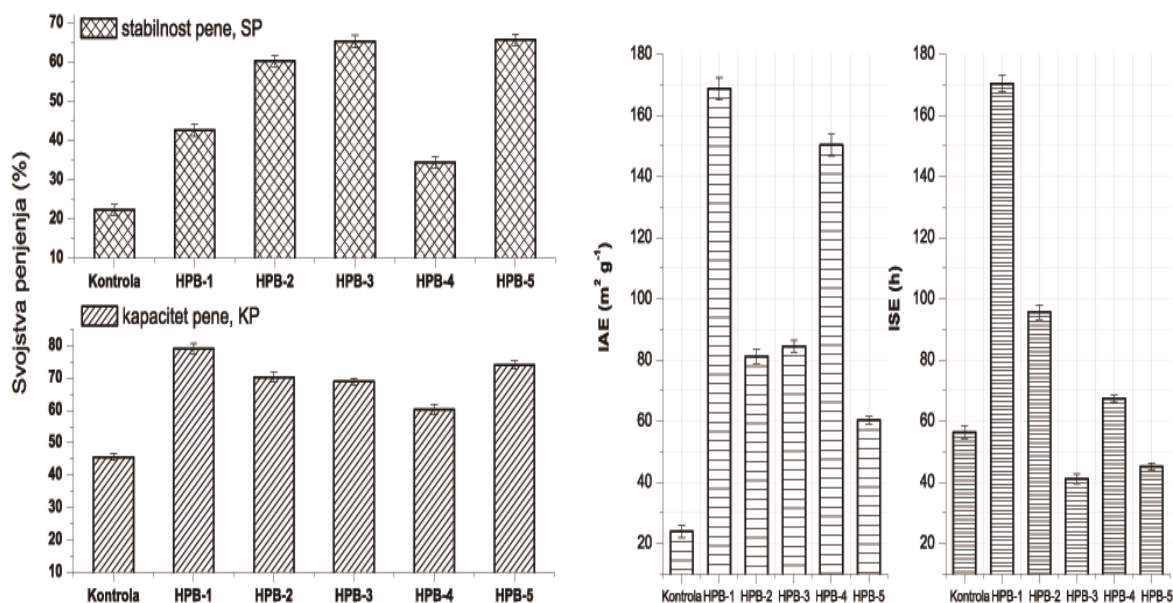
Izabrani uzorci su okarakterisani sa aspekta boje, morfologije, stabilnosti i određenih funkcionalnih svojstava sa ciljem pronalaženja odgovarajućeg hidrolizata u formi praha koji bi pokazao najbolja navedena svojstva i potencijalno bio implementiran u neki od prehrambenih proizvoda.

7.11.2.1. Tehnološko-funkcionalna svojstva

Svojstva penjenja i emulgjuća svojstva spršenih uzoraka prikazanih u Tabeli 7.9. predstavljena su na Slici 7.35.

Iz dobijenih rezultata zaključuje se da su svi ispitani uzorci pokazali poboljšanje svojstava penjenja i emulgujućih svojstava, u poređenju sa kontrolom (osušeno belance bez ikakvog pretretmana i hidrolize).

Što se tiče kapaciteta penjenja, najveći kapacitet (78,98%) postignut je kod ultrazvučno pretretiranog uzorka HPB-1 primenom jednostepenog enzimskog postupka (alkalaza), uz prečišćavanje obavljenom dijalizom i sušenjem na temperaturi od 180°C. Takođe, veoma visoke vrednosti kapaciteta pene dali su i uzorci HPB-2 (70,26%) i HPB-5 (73,91%). U odnosu na kontrolu, ostvareno je povećanje od 73,2%, 54,1% i 62,1% za HPB-1, HPB-2 i HPB-5, redom. Rezultati dobijeni za stabilnost pene su pokazali isti trend kao i za kapacitet pene, sa izuzetkom kod uzorka HPB-1. Najstabilniju penu formirao je uzorak HPB-5 (65,67%), zatim uzorak HPB-3 (65,27%) i HPB-2 (60,26%). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da pretretman proteina belanceta ultrazvučnom sondom (UZS-20kHz), praćen jednostepenom enzimskom hidrolizom rezultuje najvišim kapacitetom penjenja, dok je najveća stabilnost pene zabeležena, takođe, nakon ultrazvučnog pretretmana (UZK-40kHz), ali tokom dvostepene enzimske hidrolize. Važno je istaći da se kapacitet pene nije narušio nakon sušenja uzoraka i da su dobijene vrednosti u granici statističke greške, te se mogu konstatovati poklapanja rezultata sa istim dobijenim analizom tečnih hidrolizata (Tabela 7.4, Slika 7.25).



Slika 7.35. Svojsva penjenja i emulgujuća svojstva hidrolizata proteina belanceta osušenih tehnikom sprej sušenja

Najveća sposobnost stvaranja emulzije, izražena kao indeks aktivnosti emulzije (*IAE*), zabeležena je kod uzorka HPB-1 ($168,6 \text{ m}^2/\text{g}$). Za razliku od stabilnosti pene, ovaj uzorak se pokazao kao najpogodniji za dobijanje najstabilnije emulzije. Dobijena vrednosti indeksa stabilnosti emulzije, *ISE*, iznosila je 170,31 h. U poređenju sa kontrolom, ostvareno je povećanje *IAE* i *ISE* za 607,2% i 202,7%, redom. Takođe, veliku aktivnost stvaranja emulzije je pokazao i hidrolizat papaina pretretiran UZS-20kHz (HPB-4), ali njegova emulzija nije ostala stabilna tokom vremena. Interesantno je napomenuti da je uzorak HPB-2 dao jako stabilnu emulziju (*ISA* = 95,56 h) iako je vrednost dobijena za *IAE* iznosila $81,11 \text{ m}^2/\text{g}$, u poređenju sa uzorkom HPB-3, čija je vrednost *IAE* bila približno ista ($84,44 \text{ m}^2/\text{g}$), ali je zabeležena izrazito niska stabilnost od 41,11 h. I u ovom slučaju se ultrazvučni pretretman pokazao kao efikasan, jer su zabeleženi približno isti rezultati emulgujućih svojstava u poređenju sa onim dobijenim analizom tečnih hidrolizata dobijenih pod istim uslovima. Utvrđeno je da tehnika sprej sušenja nije dovela do značajnih gubitaka emulgujućih svojstava osušenih hidrolizata.

Veoma je malo dostupnih podataka u literaturi koji su se bavili uticajem sušenja hidrolizata proteina na emulgujuća svojstva i svojstva penjenja osušenih hidrolizata. Konkretno, za hidrolizate proteina belanceta dobijene pomoću papaina, manifestovano je smanjenje kapaciteta i stabilnosti pene, *IAE* i *ISE* nakon sprej sušenja pri ulaznoj temperaturi od 170-180 °C i izlaznoj od 70-80 °C, u poređenju sa tečnim hidrolizatima papaina [230]. Vrednosti *IAE* i *ISE* su bile $26 \text{ m}^2/\text{g}$ i 0,5 h, što je neuporedivo manje u odnosu na iste vrednosti dobijene u okviru istraživanja sprovedenih tokom izrade ove disertacije. Obzirom da je u pitanju isti supstrat, isti enzim i gotovo identični uslovi sprej sušenja, bolja emulgujuća svojstva se mogu pripisati uticaju ultrazvučnog pretretmana pre reakcije enzimske hidrolize proteina belanceta. Lečavalier (Lechevalier) i sar. (2007) su utvrdili da sušenje negativno utiče na svojstva penjenja proteina belanceta usled velikog uticaja prenosa toplote koje je karakteristično za sprej sušenja [439]. Nasuprot ovim rezultatima, Tang i sar (2003) i Linerej (Linarés) i sar. (2001) su došli do zaključka da sprej sušenje hidrolizata proteina pirinčanih mekinja i hidrolizata glutena povoljno utiče na emulgujuća svojstva osušenih hidrolizata [440,441].

Ostala funkcionalna svojstva data su Tabeli 7.10. Kao što se može primetiti, ostvareno je povećanje rastvorljivosti gotovo kod svih uzoraka (osim kod HPB-4) u poređenju sa

kontrolnim uzorkom (osušeno belance). Najveći procenat rastvorljivosti zabeležen je kod uzorka HPB-5, dobijenog u dvostepenom enzimskom postupku (alkalaza + flevorzim) nakon primene ultrazvučnog pretretmana UZK-40kHz. Takođe, značajan porast rastvorljivosti je detektovan i kod uzoraka HPB-1 i HPB-2, dobijenih u jednostepenom enzimskom postupku pomoću alkalaze, ali primenom dva različita ultrazvučna pretretmana. Korisno je istaći da su se oba primenjena ultrazvučna pretretmana (UZS-20kHz i UZK-40kHz) pokazala efikasnim u pogledu povećanja rastvorljivosti osušenih hidrolizata i da nije primećena statistički značajna ($p>0,05$) razlika u dobijenim vrednostima kod ova dva uzorka. Uzorak HPB-3 nije doveo do značajnog povećanja ($p>0,05$) rastvorljivosti u poređenju sa kontrolom. Generalno, može se konstatovati dobro slaganje rezultata sa istim rezultatima dobijenim analiziranjem tečnih hidrolizata, pa se zaključuje da sušenje hidrolizata tehnikom sprej sušenja nije dovelo do narušavanja rastvorljivosti testiranih uzoraka. Dobra rastvorljivost je zadržana kod svih uzoraka, navodeći na zaključak da sprej sušenje nije uticalo na promene polarnosti i broj jonizujućih grupa kod hidrolizata, a da su manji peptidi dobijeni nakon enzimske hidrolize očuvali svoju polarnost i pokazali i dalje jak afinitet ka formiranju vodoničnih veza sa molekulima vode, utičući na taj način na rastvorljivost hidrolizata.

Tabela 7.10. Funkcionalna svojstva osušenih hidrolizata proteina belanceta

Uzorak	Rastvorljivost na pH 8, (%)	Kapacitet vezivanja vode, KVV (g _{vode} /g _{uzorka})	Kapacitet vezivanja ulja, KVU (g _{ulja} /g _{uzorka})	Disperziono vreme, (s)
HPB-1	85,68 ± 1,12	2,34 ± 0,12	1,49 ± 0,94	5,21 ± 0,89
HPB-2	84,97 ± 1,94	1,61 ± 0,27	1,24 ± 0,87	7,47 ± 0,94
HPB-3	80,12 ± 1,04	0,84 ± 0,03	1,16 ± 0,67	16,66 ± 1,23
HPB-4	74,69 ± 1,45	1,27 ± 0,98	1,21 ± 0,51	9,67 ± 1,04
HPB-5	95,37 ± 1,76	1,43 ± 0,21	1,32 ± 0,71	15,34 ± 1,47
Belance	79,24 ± 1,81	0,63 ± 0,06	0,56 ± 0,08	34,21 ± 1,36

Kapacitet vezivanja vode (KVV) predstavlja količinu vode koja se vezuje za hidratisani uzorak nakon primene centrifugalne gravitacione sile ili kompresije [442]. Po definiciji

datoj u Oksfordskom rečniku, *KVV* se definiše kao količina vode koju čestica može da adsorbuje. Konkretno, u slučaju molekula proteina, *KVV* se odnosi na sposobnost proteina da vežu određenu količinu vode pomoću vodoničnih veza i da molekule vode smeste unutar matrice nastale povezivanjem peptidnih lanaca putem elektrostatičkih interakcija između polarnih aminokiselinskih ostataka i naelektrisanih aminokiselina [443]. Na osnovu podataka datih u Tabeli 7.10 može se zaključiti da je najveći *KVV* pokazao uzorak HPB-1 čime je ostvareno povećanje od 271,4% u odnosu na kontrolu. Isto tako, zadovoljavajuće vrednosti su zabeležene kod uzoraka HPB-2, HPB-4 i HPB-5, dok ostvareno povećanje *KVV* kod uzorka HPB-3 nije bilo statistički značajno ($p > 0,05$) u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Kada se uporede samo uzorak HPB-1 (pretretman UZS-20kHz, alkalaza) i HPB-3 (termički pretretman, alkalaza), može se reći da je ultrazvučni pretretman značajno doprineo povećanju *KVV* u odnosu na tradicionalni termički tretman procesiranja belanceta i da je ostvareno povećanje od 178,6%. Visoke vrednosti *KVV* su pokazatelj da HPB-1 u formi praha može imati potencijalnu primenu u prehrambenim proizvodima koji zahtevaju očuvanje svežine i teksture proizvoda tokom skladištenja i čuvanja.

Kapacitet vezivanja ulja (*KVU*) je, takođe, važno funkcionalno svojstvo proteina koje zavisi od površinskih karakteristika i hidrofobnosti molekula [444]. Sposobnost proteina da adsorbuju ulje je od velikog značaja za prehrambene proizvode, jer se na taj način sprečava gubitak ulja iz namirnica koji nastaje tokom termičke obrade i pripreme hrane u kućnim uslovima. Sa zdravstvenog aspekta, poželjno je da namirnice sadrže određeni procenat ulja, jer se njegovim izlučivanjem u organizam smanjuje nivo holesterola u krvnoj plazmi [445]. Što se tiče rezultata *KVU* prikazanih u Tabeli 7.10 može se primeti povećanje svojstva vezivanja ulja kod svih hidrolizata u poređenju sa kontrolom. Najveći *KVU* pokazao je uzorak HPB-1, što je u skladu sa njegovom sposobnošću formiranja emulzije, jer je sa njim zabeležen i najveći indeks aktivnosti emulzije (Slika 7.35). Osim uticaja ultrazvučnog pretretmana, koji je uzrokovao povećanje hidrofobnosti molekula proteina, može se reći i da je sušenja uzorka uticalo na povećanje površine proteina odgovorne za adsorpciju ulja, koja se manifestovala značajnim povećanjem *KVU*, kako kod uzorka HPB-1, tako i kod uzoraka HPB-2, HPB-4 i HPB-5.

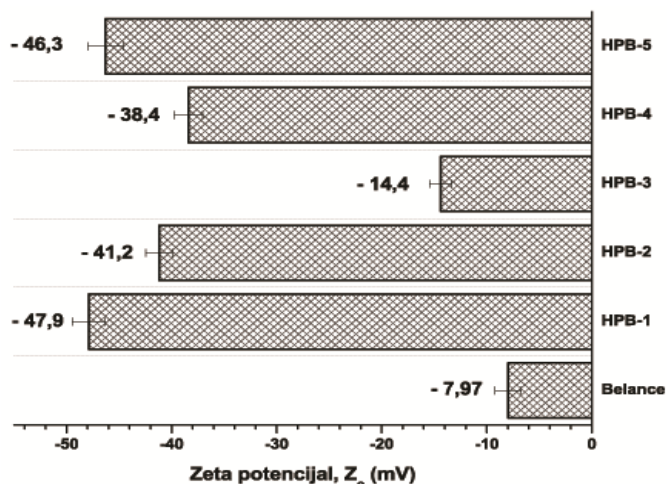
Što se tiče disperzionog vremena, primećeno je da je uzorku HPB-1, dobijenom nakon jednostepene enzimske hidrolize katalizovane alkalazom, pretretiranog ultrazvučnim

talasima frekvence 20 kHz tokom 15 min, bilo potrebno najmanje vremena da se potpuno rastvori u vodi. Nešto duže disperziono vreme zabeleženo je kod HPB-2 koji je dobijen, takođe, nakon jednostepene enzimске hidrolize katalizovane alkalazom, ali je pretretiran ultrazvučnim talasima frekvence 40 kHz tokom 15 min, kao i kod uzorka HPB-4 koji je dobijen nakon jednostepene enzimске hidrolize katalizovane papainom i pretretiranog ultrazvučnim talasima frekvence 20 kHz tokom 5 min. U poređenju sa kontrolnim uzorkom (belance), ova tri uzorka dala su najbolje rezultate, a disperziono vreme je smanjeno približno sedam, pet i četiri puta, za uzorke HPB-1, HPB-2 i HPB-4, redom. Generalno posmatrano, hidrolizati dobijeni iz ultrazvučno pretretiranih proteina i dobijeni u jednostepenom enzimskom postupku pomoću alkalaze ili papaina imaju najbolja disperziona vremena, dok su dvostepena enzimska hidroliza (HPB-5), kao i termički pretretman proteina (HPB-3) dali približno ista disperziona vremena, ali daleko veća, u odnosu na hidrolizate dobijene nakon jednostepene enzimске hidrolize. Stoga, može se reći da ultrazvučno pretretirani uzorci naknadno hidrolizovani pomoću alkalaze ili papaina predstavljaju potencijalno dobar izbor prilikom formulisanja krajnjeg proizvoda namenjenog za primenu u prehrambenoj industriji.

7.11.2.2. Zeta potential

Što se tiče površinskog naelektrisanja, dobijene su negativne vrednosti zeta potencijala (Z_o) i nakon sušenja hidrolizata, sugerišući da su se stabilnost i elektrokinetički potencijal hidrolizata održali stabilnim i nakon sprej sušenja. Ovi rezultati se mogu dovesti u vezi sa dobrom rastvorljivošću sprasjenih hidrolizata (Tabela 7.10). Upoređujući uticaj primenjenog pretretmana i specifičnosti enzima, mogu se konstatovati značajne ($p < 0,05$) razlike u dobijenim vrednostima Z_o nakon sušenja hidrolizata, u poređenju sa kontrolom. Prikazani rezultati su u saglasnosti sa postignutim stepenima hidrolize (Tabela 7.9), pa se može zaključiti da je povećanje stepena hidrolize uticalo i na povećanje površinskog naelektrisanja molekula proteina belanceta, što je u skladu sa rezultatima objavljenim od strane drugih istraživača [401]. Kako je kod HPB-1 ostvaren najveći stepen hidrolize, tako je i vrednost Z_o najveća, što će reći da su se proteini belanceta pretretirani 15 min sondom frekvence 20 kHz pokazali kao najstabilniji i poseduju molekule sa dovoljnom količinom negativnog naelektrisanja koje ne dovodi do aglomeracije i fluktuacije molekula proteina

belanceta tokom procesa sprej sušenja. Generalno, visoke vrednosti Z_o mogu biti indikator odbojnih elektrostatičkih sila između molekula proteina koje su odgovorne za sprečavanje agregacije proteina, a samim tim i na povećanje njihove stabilnosti tokom skladištenja i čuvanja. Kako su funkcionalna svojstva proteina uslovljena elektrostatičkim interakcijama među molekulima, zaključuje se da zadržana poboljšana funkcionalna svojstva hidrolizata nakon sprej sušenja mogu biti i posledica njihove velike stabilnosti i visokog negativnog površinskog naelektrisanja molekula proteina.



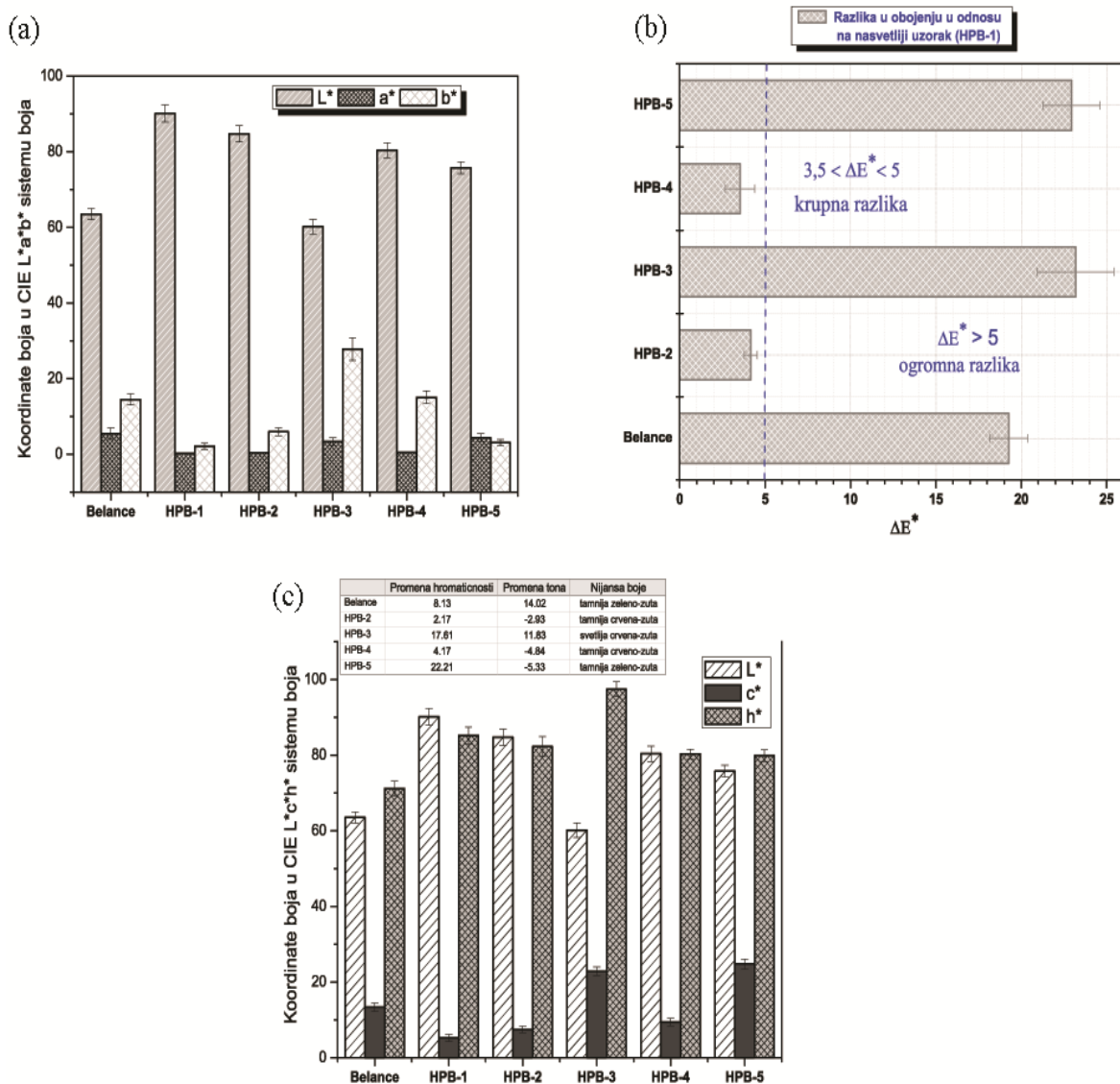
Slika 7.36. Vrednosti zeta potencijala osušenih hidrolizata proteina belanceta

7.11.2.3. Instrumentalno određivanje boje prahova hidrolizata proteina belanceta

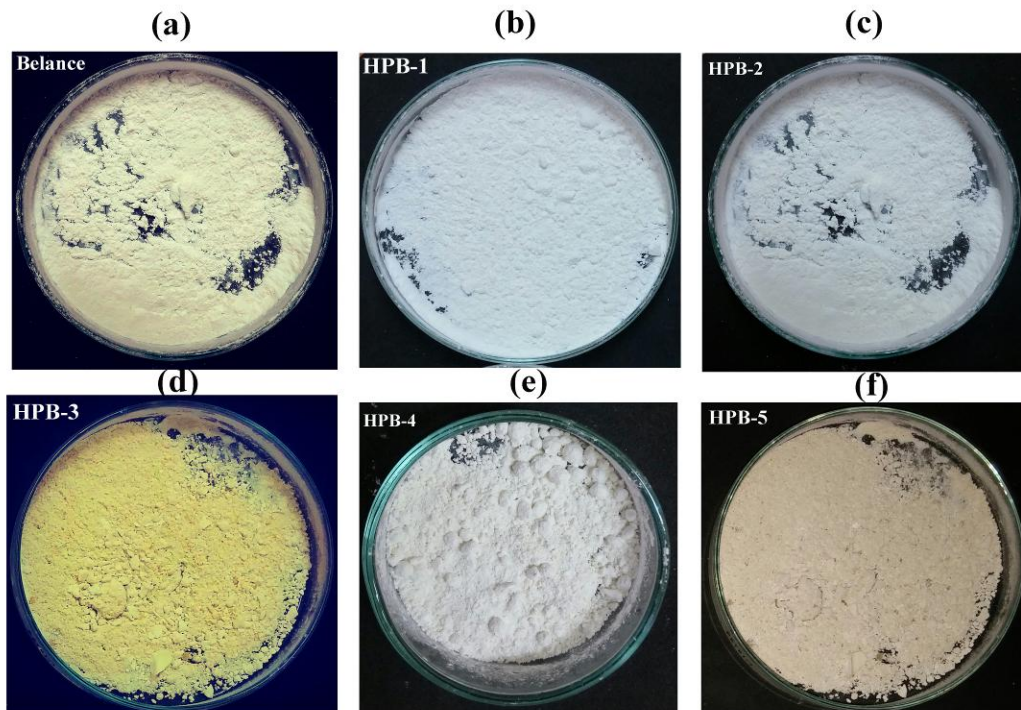
Boja je jedan od osnovnih parametara kvaliteta hrane i njene promene mogu da utiču na nutritivna i organoleptička svojstva hrane. Uslovljena je različitim faktorima, kao što su vrsta polazne sirovine, način procesiranja, sadržaj masti, prisustvo vlage, svetlost, temperatura, kao i dodatak različitih proteinskih suplemenata unutar finalne formulacije proizvoda [446].

Instrumentalno određivanje boje prahova hidrolizata proteina belanceta obuhvatalo je merenje parametara L^* (svetlina), a^* (udeo crvene, odnosno zelene boje), b^* (udeo žute, odnosno plave boje), c^* (zasićenost boje - ton) i h^* (nijansa boje - hromatičnost). Referentni uzorak na osnovu koga je izvršeno poređenje ispitivanih uzoraka i određena razlika obojenja među njima (ΔE^*), bio je tabletirani hidrolizat pripremljen enzimskom hidrolizom ultrazvučno (20 kHz - 15 min) pretretiranog belanceta (HPB-1). Ovaj uzorak je uzet kao

referentni kako bi se ispitaio uticaj ultrazvučnog pretretmana na boju dobijenih osušenih hidrolizata. Na osnovu dobijenih vrednosti svetline ($L^* = 0$ crno, $L = 100$ belo), vrednosti crveno/zeleno koordinate boje (a^*), kao i vrednosti žuto/plavo koordinate boje (b^*), izvršena su poređenja uzoraka sa kontrolnim uzorkom. Rezultati su prikazani na Slici 7.37 i 7.38.



Slika 7.37. Merenje koordinata boja prahova hidrolizata u $L^* a^* b^*$ sistemu boja (a), razlika u obojenju (b) i $L^* c^* h^*$ sistemu boja (c)



Slika 7.38. Hidrolizati proteina belanceta osušeni sprej sušenjem pod sledećim uslovima: ulazna temperatura: 180 ° C, izlazna temperatura 90 ° C, protok tečnosti 6 ml/min, protok komprimovanog vazduha za disperziju tečnosti 800 l/h

Na osnovu Slike 7.37a, može se zaključiti da vrsta primenjenog pretretmana, kao i način izvođenja enzimske reakcije hidrolize, imaju značajan uticaj na boju testiranih uzoraka. Zabeleženo je povećanje L^* vrednosti (svetlina) kod uzoraka HPB-1, HPB-2, HPB-4 i HPB-5, u poređenju sa kontrolnim uzorkom (balance). Najsvetliji uzorak ($L^* = 90,12$), sa skoro potpuno belom bojom praha, dobijen je nakon pretretmana ultrazvučnom sondom UZS-20kHz i njihovom kasnijom jednostepenom enzimskom hidrolizom katalizovanom alkalazom (HPB-1). Takođe, ovaj uzorak je pokazao najveće smanjenje a^* i b^* koordinata boje, što je i vizuelno potvrđeno (Slika 7.38). Uzorak HPB-2 je, isto tako, dao izrazito veliku L^* vrednost (84,72), sa neznatno većim udelom žuto/plavo koordinate boje (b^*), u odnosu na uzorak HPB-1. Nije primećena statistički značajna ($p > 0,05$) razlika u tonu (c^*) i hromatičnosti (h^*) među uzorcima HPB-1, HPB-2, HPB-4 i HPB-5 (Slika 7.37c). Na osnovu vrednosti parametara a^* i b^* zapaža se prisustvo žutog tonakod uzorka HPB-3 ($b^* = 27,83$), što je u skladu sa Slikom 7.38. Instrumentalno određivanje definisalo je boju uzorka HPB-3 na granici između žuto–crvene (Slika 7.37c). Primena termičkog pretretmana

doprinosi žutom tonu i pri tom povećava nijansu boje (h^*) (Slika 87.37c) dajući najveću razliku u obojenju u odnosu na uzorak HPB-1 koji se pokazao kao najsvetliji (Slika 7.37b). Žuta boja praha može da bude posledica odvijanja neenzimske Majlardove reakcije karamelizacije tokom termičkog pretretmana, koja je dovela do tamnjenja uzorka HPB-3. Da bi uopšte došlo do odvijanja Majlardove reakcije, neophodno je prisustvo karbonilne grupe (npr. redukujući šećer) i slobodne amino grupe proteina ili molekula aminokiselina. Poznato je da se u belancetu nalazi mali udeo glukoze ($\leq 0,07\%$), pa se može pretpostaviti da ona reaguje sa ostacima lizina i aminokiselinskim ostacima na N-terminalnom kraju dobijenih peptida nakon enzimske hidrolize, utičući na taj način na odvijanje termičke reakcije redukcije šećera aminokiselinama (Majlardova reakcije). Isto tako, zna se da belance sadrži i određen sadržaj lipida (oko 0,04%) koji mogu uticati na formiranje karbonilnih jedinjenja [447]. Nastanak ovih karbonilnih jedinjenja se dovodi u vezu sa lipidnom oksidacijom nastalom tokom skladištenja belanceta i ona, takođe, mogu biti odgovorna za odvijanje Majlardove reakcije sa aminokiselinama, dovodeći do tamnjenja krajnjeg proizvoda [448]. Studije Stjuarta (Stewart) i sar. (1948) i Štapelfelt (Stapelfeldt) i sar. (1997) su pokazale da mala količina glukoze (0,02%) značajno utiče na obojenje osušenog albumina i da je primećen porast prisustva karbonilnih jedinjenja u punomasnom mleku u prahu tokom skladištenja na 25 °C u roku od dva meseca (od 1,7% do 4,1%) [449,450].

U poređenju sa literaturnim podacima, kod uzoraka HPB-1, HPB-2, HPB-4 i HPB-5 je zabeležena veća vrednost L^* koordinate boje, navodeći na zaključak da su se dobili svetliji prahovi sa većim udelom bele boje. Pojedini autori su utvrdili da je svetlina (L^*) hidrolizata proteina belanceta dobijenih pomoću papaina i osušenih tehnikom sprej sušenja ($T_{ul}= 170 - 180$ °C, $T_{iz}= 70 - 80$ °C, protok 4 ml/min) iznosila 75,21, dok su vrednosti koordinata boje a^* i b^* iznosile 4,17 i 11,69, redom [230]. Isto tako, drugi istraživači su dobili L^* vrednost koordinate boje belanceta osušenog sprej sušenjem od 77,91, sa vrednostima koordinata boje a^* i b^* od -6,21 i 10,35, redom [451].

Uopšteno govoreći, promena boje praha se može smatrati kompleksnim fenomenom na koji mogu uticati različiti faktori, a jedan od bitnijih faktora jesu reakcije oksidacije koje su javljaju tokom procesa sprej sušenja usled prisustva određene koncentracije kiseonika u struji toplog gasa. Kako su u ovom radu, svi uzorci osušeni pri istim procesnim

parametrima datim u Tabeli 7.7., efekat oksidacije hidrolizata tokom sušenja može se smatrati konstantnim za sve uzorke, ali je potrebno istaći i da se sušenje vršilo u jako kratkim vremenskim intervalima, stoga je uticaj reakcija oksidacije sveden na minimum.

Generalno, može se zaključiti da ultrazvučno pretretirani uzorci (HPB-1, HPB-2, HPB-4 i HPB-5) imaju bolje karakteristike sa aspekta obojenosti od termički pretretiranog, osušenog uzorka pri istim uslovima. Isto tako, sa aspekta boje, bolja svojstva imaju uzorci koji su dobijani u jednostepenom enzimskom procesu (HPB-1, HPB-2, HPB-4), dok je hidrolizat dobijen kombinacijom enzima alkalaza + flevorzim (HPB-5) dao obojeniji prah sa primesom zeleno-žutog obojenja (Slika 7.37c). Ono što posebno treba naglasiti je da je uzorak HPB-1 dobijen sušenjem hidrolizata pretretiranog ultrazvučnim talasima frekvence 20 kHz pokazao najbolja svojstva: veće indekse svetline, kraće disperziono vreme i poboljšana ostala funkcionalna svojstva, što je od velikog značaja za krajnju primenu proizvoda i predstavlja izuzetan doprinos koji bi omogućio zamenu tradicionalnog termičkog tretmana procesiranja proteina belanceta i dobijanje proizvoda zadovoljavajuće boje i funkcionalnosti.

7.11.2.4. Senzorna analiza praškastih hidrolizata proteina belanceta

Glavni problem sa kojim se susrećemo pri pokušaju komercijalizacije proteinskih hidrolizata jeste gorak ukus većine hidrolizata koji je posledica prisustva hidrofobnih aminokiselinskih sekvenci u kratkim peptidima. Gorčina hidrolizata proteina negativno utiče na senzorna svojstva finalnog proizvoda, a javlja se usled nastanka peptida sa malom molekulskom masom nakon enzimske reakcije hidrolize koji su sastavljeni uglavnom od hidrofobnih aminokiselinskih ostataka. Aminokiseline koji najviše doprinose gorčini nastalih hidrolizata jesu valin, izoleucin, fenilalanin, triptofan, leucin i tirozin [452]. Postoji veliki broj radova koji se bavio ovom tematikom i neki od pokušaja smanjenja gorčine hidrolizata jesu: tretman aktivnim ugljem, alkoholna ekstrakcija, precipitacija, hromatografija, kontrolisanje stepena hidrolize proteina, kondenzovanje hidrolizata putem plasteinske reakcije indukovane proteazama ili korišćenje specifičnih enzima, kao što su egzopeptidaze [289,453-455].

U okviru ove disertacije, ispitana je gorčina hidrolizata dobijenih iz ultrazvučno i termički pretretiranih proteina belanceta prethodno hidrolizovanih pod različitim uslovima i

osušenih tehnikom sprej sušenja pri usvojenim procesnim parametrima. Analiziran je uticaj primenjenog pretretmana i enzimske hidrolize katalizovane različitim proteazama na prisustvo ili odsustvo gorkog ukusa dobijenih hidrolizata u formi praha. Na osnovu senzorne evaluacije šest individua ocenjena je gorčina hidrolizata, a rezultati su izraženi u jedinicama koncentracije rastvora kofeina iste gorčine i prikazani su u Tabeli 7.11. Kofein je pripremljen u opsegu koncentracija 2-8 mg/ml.

Tabela 7.11. Senzorna evaluacija gorčine dobijenih hidrolizata

Uzorak	Individua					
	1	2	3	4	5	6
HPB-1	1 ^a	1 ^a	2 ^a	0 ^a	1 ^a	1 ^a
HPB-2	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	2 ^a	3 ^a
HPB-3	6 ^b	8 ^b	7 ^b	7 ^b	8 ^b	6 ^b
HPB-4	3 ^a	4 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a	2 ^a
HPB-5	2 ^a	2 ^a	1 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a
Balance	5	6	6	6	5	5

^a statistički značajno u odnosu na kontrolu (balance),

^b statistički nije značajno u odnosu na kontrolu (balance).

Na osnovu dobijenih rezultata zaključuje se da najmanju gorčinu poseduje hidrolizat pretretiran ultrazvukom frekvence 20 kHz u vremenu od 15 min, hidrolizovan alkalazom, prečišćen dijalizom, uz naknadno sušenje na 180 °C (HPB-1). Isto tako, zaključuje se da kombinacija enzima alkalaza + flevorzim u dvostepenom enzimskom postupku, takođe, povoljno utiče na smanjenje gorčine ultrazvučno pretretiranih hidrolizata, čime je uzorak HPB-5 okarakterisan kao prijatan za konzumiranje (bez slanog, neprijatnog i gorkog ukusa). Flevorzim, kao egzopeptidaza, smanjuje gorčinu hidrolizata HPB-5, jer deluje na terminalne krajeve peptidnog lanca čime dovodi do oslobađanja aminokiselina koje ne poseduju hidrofobni karakter zaslužan za gorčinu peptida nastalih nakon hidrolize. Pregledom literature ustanovljeno je da se upotreba egzopeptidaza smatra veoma efikasnom za regulisanje gorčine proteinskih hidrolizata. Egzopeptidaza iz *Aspergillus oryzae* se pokazala kao korisna za smanjenje gorčine hidrolizata kazeina, proteina surutke i glutena, a takođe i aminopeptidaze iz *Streptococcus lactis* i *Thermus aquaticus* YT-1. Sa druge strane, pšenična karboksipeptidaza dovela je do smanjenja gorčine hidrolizata kazeina oslobađanjem aminokiselina sa C-terminalnog kraja peptida [452].

Uopšteno govoreći, svi ultrazvučno pretretirani uzorci prema oceni ispitanika su pokazali statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje gorčine u poređenju sa kontrolnim uzorkom, ali se ne može sa sigurnošću tvrditi da je to zaista tako. Jedino kod uzorka HPB-3, koji je bio pretretiran termičkim tretmanom nije primećeno statistički značajno ($p > 0,05$) smanjenje gorčine. Pošto je ostvaren mali stepen hidrolize (SH = 18,93%), u odnosu na ultrazvučno pretretirane hidrolizate, bilo je očekivano da će gorčina ovog uzorka biti smanjena, ali zabeležen je drugačiji rezultat. Ovo se može objasniti činjenicom da je termički tretman izazvao takvu denaturaciju proteina, formirajući proteinske domene nepristupačne dejstvu alkalaze koji u svom sastavu nisu imali aromatične, alifatične i hidroksilne aminokiselinske sekvence, odgovorne za veliku specifičnost alkalaze. Sa druge strane, smanjena gorčina hidrolizata pretretiranih ultrazvučnim talasima je posledica drugačijeg mehanizma dejstva ultrazvučnih talasa na samu strukturu i organizaciju molekula proteina. Smatra se da je ultrazvuk, takođe, uticao na promenu konformacije proteina i reorganizaciju strukture, dovodeći do povećanja hidrofobnosti molekula, ali na takav način da je nakon hidrolize peptidnih veza došlo do formiranja aminokiselinskih lanaca koji su na terminalnim krajevima imali hidrofobne aminokiseline. Poznato je da kada su hidrofobne aminokiseline locirane na N- ili C-terminalnom kraju one manje utiču na gorčinu hidrolizata, u poređenju sa istim lociranim u unutrašnjosti molekula proteina [456]. Analizom dobijenih rezultata, može se reći da je uzorak tretiran ultrazvukom frekvence 20 kHz (HPB-1) pokazao najviši stepen hidrolize (SH = 39,01%) i najmanju gorčinu (prema oceni izabranih ispitanika), što ukazuje na mogućnost kombinacije ova dva postupka u cilju dobijanja prahova zadovoljavajućih svojstava. Primena odgovarajućih proteaza i optimizovanog postupka ultrazvukom rezultovala je poboljšanim senzornim svojstvima hidrolizata proteina belanceta.

Na osnovu svih iznetih rezultata jasno se zaključuje da su svi hidrolizati pretretirani ultrazvučnim talasima pokazali dobre rezultate sa aspekta funkcionalnih, organoleptičkih i senzornih svojstava. Među njima, kao najbolji, pokazao se uzorak HPB-1, pretretiran ultrazvukom frekvence 20 kHz u vremenu od 15 min, hidrolizovan alkalazom, prečišćen dijalizom, uz naknadno sušenje na 180 °C. Kako bi se utvrdio uticaj sušenja na funkcionalna svojstva spraćenog HPB-1, urađena je uporedna analiza tečnog i spraćenog HPB-1 i rezultati su dati u Tabeli 7.12. Na osnovu prikazanih rezultata može se

konstatovati da se rastvorljivost, svojstva penjenja i emulgujuća svojstva nisu značajno promenila nakon sprej sušenja, što je od velikog značaja za potencijalnu primenu hidrolizata kao nutritivnih proteinskih dodataka za specijalne potrošačke grupe. Takođe, uzorak HPB-1 je okarakterisan sa aspekta hemijskog sastava i upoređen je sa hidrolizatom koji je bio pretretiran termičkim tretmanom i sa netretiranim osušenim belancetom (kontrola). Rezultati su predstavljeni u Tabeli 7.13.

Tabela 7.12. Uporedni pregled funkcionalnih svojstava HPB-1 pre i posle sušenja pod optimalnim uslovima

Ispitivano svojstvo	Sprašeni hidrolizat	Tečni hidrolizat
Rastvorljivost na pH 8,%	85,68 ± 1,12	87,20 ± 1,34
Kapacitet pene, KP,%	78,68 ± 1,12	80,92 ± 1,13
Stabilnost pene, SP,%	42,67 ± 1,59	43,18 ± 1,04
Indeks aktivnosti emulzije, IAE, m ² /g	168,6 ± 3,67	169,9 ± 2,47
Indeks stabilnosti emulzije, ISE, h	170,31 ± 2,59	172,37 ± 2,69
Zeta potencijal, mV	-47,9 ± 0,89	-48,2 ± 1,11

Tabela 7.13. Hemijski sastav osušenih HPB u poređenju sa osušenim netretiranim belancetom pod istim uslovima

	Sadržaj vlage (%)	Sadržaj proteina (%)	Sadržaj pepela (%)	Sadržaj lipida (%)
Sprašeni hidrolizat proteina belanceta pretretiran UZS-20kHz (HPB-1)	3,56 ± 0,89	75,65 ± 1,59	5,01 ± 0,94	2,01 ± 0,04
Sprašeno belance	3,08 ± 0,06	68,94 ± 1,14	3,98 ± 0,67	1,90 ± 0,06

U poređenju sa kontrolom, primećen je povećan sadržaj proteina kod HPB-1. Nije primećena statistički značajna ($p > 0,05$) razlika u sadržaju vlage, ali se može reći da je ostvareno znatno povećanje pepela kod uzorka HPB-1 u odnosu na kontrolu (sprašeno belance). Veći sadržaj pepela u odnosu na kontrolu je posledica dodavanja kiseline i/ili

baze neophodnih za regulaciju optimalne pH vrednosti enzima, kao i kontrole pH tokom same reakcije hidrolize. Prisustvo ugljenih hidrata nije zabeleženo. Zbog velikog broja prednosti i dugoročnih efekata proizvodnje koji se mogu postići, pokazano je da ultrazvučni pretretman može biti alternativa tradicionalnoj termičkoj obradi proteina belanceta.

8. ZAKLJUČAK

Osnovni cilj ove disertacije bio je da se doprinese razvoju enzimskog procesa hidrolize proteina belanceta i optimizaciji ultrazvučnog pretretmana kao adekvatnoj zameni za tradicionalni termički pretretman procesiranja proteina belanceta u prehrambenoj industriji. U okviru ove doktorske disertacije definisani su procesni parametri pri pretretmanu proteina belanceta ultrazvukom koji su optimalni sa aspekta izvođenja enzimske hidrolize, ali i sa aspekta funkcionalnih svojstava nativnih proteina belanceta i njihovih hidrolizata. Takođe, optimizovana je i odgovarajuća tehnika sušenja koja nije uticala na narušavanje unapređenih funkcionalnih svojstava tečnih hidrolizata proteina belanceta.

Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji:

❖ Pri ispitivanju uticaja ultrazvučnog pretretmana na funkcionalna i strukturna svojstva nativnih proteina belanceta, kao i na morfologiju i karakteristike čestica, izvedeni su sledeći zaključci:

- U poređenju sa netretiranim belancetom, rastvorljivost (R_0) nativnih proteina belanceta značajno je povećana ($p < 0,05$) nakon primene sva tri ultrazvučna pretretmana, a vreme pretretmana od 15 min usvojeno kao optimalno za sva tri pretretmana.

- Utvrđen je porast kapaciteta pene (KP), stabilnosti pene (SP), indeksa aktivnosti emulzije (IAE) i indeksa stabilnosti emulzije (ISE) nativnih proteina belanceta pretretiranih ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz (UZS-20kHz), kao i ultrazvukom u kupatilima frekvence 40 kHz i 35 kHz (UZK-40kHz i UZK-35kHz). Vreme pretretmana od 15 min dalo je najbolje rezultate emulgujućih svojstava i svojstava penjenja za sva tri ultrazvučna pretretmana.

- Najveće povećanje kapaciteta pene, stabilnosti pene, indeksa aktivnosti emulzije i indeksa stabilnosti emulzije zabeleženo je nakon pretretmana UZS-20kHz i uočena je zavisnost između stabilnosti pene, IAE i ISE i dužine pretretmana, dok se kapacitet pene nije statistički značajno ($p > 0,05$) menjao tokom vremena pretretmana.

- Nakon pretretmana ultrazvučnom sondom UZS-20kHz zabeležen je statistički značajan ($p < 0,05$) porast ukupnih i reaktivnih sulfhidrilnih grupa, a sličan trend ostvaren je i nakon pretretmana UZK-40kHz i UZK-35kHz.

- Kod UZS-20kHz i UZK-40kHz, primećen je porast površinske hidrofobnosti (H_o) molekula proteina belanceta sa vremenom pretretmana do 15 min, dok kod UZK-35kHz nije zabeležena značajna promena ($p>0,05$) površinske hidrofobnosti tokom prvih 15 min pretretmana. Za vremenske intervale veće od 15 min zabeležen je drastičan pad H_o kod sva tri ultrazvučna pretretmana.

- Utvrđeno je da sa porastom vremena ultrazvučnog pretretmana dolazi do značajnog porasta ($p<0,05$) vrednosti zeta potencijala za sva tri ultrazvučna pretretmana. Najveće negativne vrednosti dobijene su za pretretman ultrazvučnom sondom UZS-20kHz nakon 15 min, zatim za UZK-40kHz nakon 15 min i na kraju za UZK-35kHz, takođe, nakon 15 min.

- Uočena je linearna korelacija između zeta potencijala i ostvarenog povećanja rastvorljivosti proteina belanceta, kapaciteta pene i stabilnosti pene nakon ultrazvučnog pretretmana, dok direktna korelacija između zeta potencijala i *IAE* i *ISE* nije ustanovljena.

- Pretretman proteina belanceta sondom UZS-20kHz prouzrokovao je pomeranje raspodele veličine čestica ka manjim prečnicima i uticao je na smanjenje polidisperznog indeksa (PdI), dok pretretman UZK-40kHz nije u tolikoj meri uticao na smanjenje čestica agregiranih molekula proteina belanceta.

- Dobijena je negativna linearna korelacija između veličine čestica i rastvorljivosti proteina belanceta nakon primene UZS-20kHz, a međusobna zavisnost između *IAE* i *ISE* i veličine čestica je, takođe, potvrđena i ustanovljeno je da sa smanjenjem čestica dolazi do poboljšanja emulgujućih svojstava primenom pretretmana UZS-20kHz.

- Na osnovu FE-SEM mikrografa uočeno je narušavanje proteinskih agregata usled dejstva ultrazvučnih talasa i dobijene su čestice glatke strukture sa karakterističnim konkavnim šupljinama unutar same površine.

- Ramanovom spektroskopijom pokazano je da je su pretretman sondom UZS-20kHz i ultrazvučnom kupatilu UZK-40kHz uticali na promenu sekundarne strukture proteina belanceta i ustanovljeno je da je pretretman UZS-20kHz imao veći uticaj na strukturalna svojstva.

- Zabeležen je smanjen broj aerobnih bakterija nakon pretretmana sondom UZS-20kHz, dok primenom UZK-35kHz i UZK-40kHz nije zabeleženo smanjenje broja aerobnih bakterija koje formiraju kolonije. Prisustvo *Salmonella enteritidis* i *Enterobacteriaceae* nije detektovano ni u jednom uzorkom.

❖ Pri ispitivanju uticaja ultrazvučnog pretretmana na efikasnost enzimske hidrolize proteina belanceta i tehnološko-funkcionalna svojstva dobijenih hidrolizata, izvedeni su sledeći zaključci:

- Ostvareni su veći stepeni hidrolize primenom sva tri ultrazvučna pretretmana, a kao najefikasniji pokazao se pretretman ultrazvučnom sondom UZS-20kHz. Vreme pretretmana od 15 min usvojeno je kao optimalno. Ovi rezultati su potpuno u skladu sa utvrđenim promenama u strukturi proteina belanceta usled dejstva ultrazvuka frekvence 20 kHz u toku 15 min.

- Primenom jednostepenog enzimskog postupka, alkalaza se pokazala kao najefikasnija, dok je u dvostepenom enzimsku postupku kombinacija enzima alkalaza + neutraza dala najveće prinose peptida i stepene hidrolize.

- Zagrevanjem vode ultrazvučnih kupatila frekvence 35 kHz i 40 kHz nije postignuto očekivano povećanje stepena hidrolize, jer očigledno da temosonikacija negativno utiče na konsektivnu enzimsku hidrolizu. Vreme pretretmana od 15 min i temperatura vode unutar kupatila od 25 °C usvojeni su kao optimalni.

- Primećeno je povećanje brzine enzimske reakcije sa povećanjem pH vrednosti supstrata.

- Usvojen je empirijski kinetički model koji uzima u obzir inhibiciju supstratom u višku i dezaktivaciju enzima u skladu sa kinetikom drugog reda, kao pogodan za opisivanje procesa enzimske hidrolize ultrazvučno pretretiranih proteina belanceta u šaržnom reaktorskom sistemu.

- Najveća konstanta brzine reakcije dobijena je nakon pretretmana ultrazvučnom sondom UZS-20kHz, dok je najmanje povećanje brzine reakcije ostvareno nakon pretretmana UZK-35kHz.

- Pretretman UZS-20kHz uticao je na poboljšanje tehnološko-funkcionalnih svojstava (R_o , KP , SP , IAE , ISE , SH grupe) hidrolizata dobijenih hidrolizom pomoću alkalaze i papaina. Nakon hidrolize alkalazom, ostvarena je veća hidrofobnost u vremenskim intervalima od 2-15 min, dok kod hidrolizata papaina nije primećen statistički značajan ($p > 0,05$) porast površinske hidrofobnosti sa vremenom ultrazvučnog pretretmana.

- Elektrokinetički potencijal hidrolizata održao se stabilnim nakon pretretmana UZS-20kHz.

- FTIR analizom utvrđena je razlika u strukturi hidrolizata dobijenih dejstvom alkalaze i papaina iz proteina belanceta pretretiranih UZS-20kHz.

- Morfologija hidrolizata dobijenih iz pretretiranih proteina sondom UZS-20kHz, značajno je promenjena i uočena je pojava manjih sub-jedinica, u poređenju sa hidrolizatom dobijenim iz nativnih proteina belanceta.

❖ Pri ispitivanju uticaja posthidrolitičkih procesa sušenja na funkcionalna, senzorna i organoleptička svojstva osušenih hidrolizata proteina belanceta izvedeni su sledeći zaključci:

- Tehnika sprej sušenja se pokazala kao efikasnija u odnosu na liofilizaciju sa aspekta dobijanja praha željene konzistencije i granulometrijskog sastava.

- Optimizovan je proces sprej sušenja u cilju dobijanja spršenih hidrolizata proteina belanceta željenih karakteristika.

- Primenom odgovarajućih proteaza i optimizacijom ultrazvučnog pretretmana polaznih proteina belanceta poboljšana su funkcionalna svojstva osušenih hidrolizata u poređenju sa netretiranim osušenim belancetom.

- Svi ultrazvučno pretretirani hidrolizati su pokazali statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje gorčine u poređenju sa termički pretretiranim hidrolizatom.

- Upotreba ultrazvučne sonde frekvence 20 kHz tokom 15 min predstavlja najbolji izbor za poboljšanje funkcionalnih, senzornih i organoleptičkih svojstava dobijenih prahova.

- Hidrolizat dobijen iz proteina belanceta pretretiranih UZS-20kHz se pokazao kao najsvetliji i potpuno je okarakterisan sa aspekta hemijskog sastava.

- Utvrđeno je da tehnika sprej sušenja nije uticala na narušavanje tehnološko-funkcionalnih svojstava.

- Pokazano je da ultrazvučni pretretman može biti alternativa tradicionalnoj termičkoj obradi proteina belanceta.

- Dobijeni rezultati mogu poslužiti kao osnova za uvođenje novih tehnoloških postupaka obrade prirodnih proteina poput tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta sa svrhom poboljšanja njihovih funkcionalnih, organoleptičkih i senzornih svojstava.

- Upotreba ultrazvučnog pretretmana predstavlja kraći proces koji traje nekoliko minuta, te je potrošnja energije manja u odnosu na tradicionalne tehnološke procese koji traju i po nekoliko sati.

Na osnovu dobijenih eksperimentalnih podataka i detaljnog literaturnog pregleda, naučni doprinos ove disertacije ogleda se u objašnjenju mehanizma delovanja ultrazvučnih talasa na strukturu proteina belanceta pod određenim uslovima i pokušaj uspostavljanja korelacije između strukturnih svojstava molekula i tehnološko-funkcionalnih svojstava. Razvijena metoda ultrazvučnog pretretmana i naknadne enzimske hidrolize se može smatrati pogodnim izborom za potrebe dobijanja funkcionalnih peptida iz proteina belanceta. Dobijeni hidrolizati poseduju unapređena funkcionalna svojstva, u toj meri dovoljna, da se mogu koristiti kao aditivi hrani i/ili farmaceutskim proizvodima. Finalni rezultat disertacije je potpuno okarakterisan hidrolizat proteina belanceta u formi praha koji je kao takav spreman za plasman na tržište. Rezultati i zaključci izneti u ovoj disertaciji predstavljaju osnovu za dalji razvoj funkcionalnih prehrambenih proizvoda na bazi proteina belanceta.

9. LITERATURA

- [1] Chen, C., & Chi, Y. J. (2012). Antioxidant, ACE inhibitory activities and functional properties of egg white protein hydrolysate. *Journal of Food Biochemistry*, 36(4), 383-394.
- [2] Lunow, D., Kaiser, S., Brückner, S., Gotsch, A., & Henle, T. (2013). Selective release of ACE-inhibiting tryptophan-containing dipeptides from food proteins by enzymatic hydrolysis. *European Food Research and Technology*, 237(1), 27-37.
- [3] Mine, Y. (1995). Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 6(7), 225-232.
- [4] Arzeni, C., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. (2015). Power ultrasound assisted design of egg albumin nanoparticles. *Food Biophysics*, 10(4), 439-446.
- [5] Martos, G., López-Fandiño, R., & Molina, E. (2013). Immunoreactivity of hen egg allergens: influence on in vitro gastrointestinal digestion of the presence of other egg white proteins and of egg yolk. *Food chemistry*, 136(2), 775-781.
- [6] Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International dairy journal*, 16(9), 945-960.
- [7] Huang, W. Y., Majumder, K., & Wu, J. (2010). Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. *Food Chemistry*, 123(3), 635-641.
- [8] Mine, Y. (2002). Recent advances in egg protein functionality in the food system. *World's Poultry Science Journal*, 58(01), 31-39.
- [9] Davalos, A., Miguel, M., Bartolome, B., & Lopez-Fandino, R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67(9), 1939-1944.
- [10] Mine, Y., Ma, F., & Lauriau, S. (2004). Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1088-1094.
- [11] Chen, C., Chi, Y. J., Zhao, M. Y., & Xu, W. (2012). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. *Food Science and Biotechnology*, 21(1), 27-34.

- [12] Liu, J., Yu, Z., Zhao, W., Lin, S., Wang, E., Zhang, Y., ... & Chen, F. (2010). Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 122(4), 1159-1163.
- [13] Chiang, W., Lee, M., Guo, W., & Tsai, T. (2006). Protein hydrolysate batch production with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from egg whites. *Journal of Food and Drug Analysis*, 14(4), 385-390.
- [14] Hofmeister, F. (1889). *Zeitschrift für physiologische chemie*, 14, 165.
- [15] Hofmeister, F. (1892). *Zeitschrift für physiologische chemie*, 16, 187.
- [16] Osborne, T. B. & Campbell, G. F. (1900). *Journal of the American Chemical Society*, 22, 422.
- [17] Hektoen, L. & Cole, A. G. (1928). *Journal of Infections Diseases*, 42, 1.
- [18] Drakos, A., & Kiosseoglou, V. (2006). Stability of acidic egg white protein emulsions containing xanthan gum. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(26), 10164-10169.
- [19] Hui, Y. H., & Al-Holy, M. A. (Eds.). (2007). *Food chemistry: Principles and Applications* (2nd ed.). West Sacramento, CA: Science Technology System.
- [20] Stadelman, W. J., Newkirk, D., & Newby, L. (1995). *Egg science and technology*. CRC Press.
- [21] Karimpil, J. J., Melo, J. S., & D'Souza, S. F. (2011). Hen egg white as a feeder protein for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71(3), 113-118.
- [22] Gulla, K. C., Gouda, M. D., Thakur, M. S., & Karanth, N. G. (2004). Enhancement of stability of immobilized glucose oxidase by modification of free thiols generated by reducing disulfide bonds and using additives. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(6), 621-625.
- [23] Kubal, B. S., & D'Souza, S. F. (2004). Immobilization of catalase by entrapment of permeabilized yeast cells in hen egg white using glutaraldehyde. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 59(1), 61-64.
- [24] Kovacs-Nolan, J., Phillips, M., & Mine, Y. (2005). Advances in the value of eggs and egg components for human health. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(22), 8421-8431.

- [25] USDA. 1999. USDA nutrient database for standard reference, release 13. Preuzeto sa <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>.
- [26] Campbell, L., Raikos, V., & Euston, S. R. (2003). Modification of functional properties of egg-white proteins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 47(6), 369-376.
- [27] Stevens, L. (1991). Egg white proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 100(1), 1-9.
- [28] Alleoni, A. C. C. (2006). Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. *Scientia Agricola*, 63(3), 291-298.
- [29] López-Fandiño, R., Recio, I., & Ramos, M. (2007). Egg-protein-derived peptides with antihypertensive activity. *Bioactive egg compounds*, 199-211.
- [30] Hoppe, A. (2010). Examination of egg white proteins and effects of high pressure on select physical and functional properties. University of Nebraska, Lincoln, USA.
- [31] Smith, M. B., & Back, J. F. (1965). Studies on ovalbumin II. The formation and properties of S-ovalbumin, a more stable form of ovalbumin. *Australian journal of biological sciences*, 18(2), 365-377.
- [32] Kato, A., Tanaka, A., Matsudomi, N., & Kobayashi, K. (1986). Deamidation of ovalbumin during S-ovalbumin conversion. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(9), 2375-2376.
- [33] Doi, E. & Kitabatake, N. (1997). Structure and functionality of egg proteins. In: Damodaran, S. & Paraf, A. (Eds), *Food proteins and their applications* (pp. 325-340), New York, Marcel Dekker.
- [34] Iametti, S., Donnizzelli, E., Vecchio, G., Rovere, P. P., Gola, S., & Bonomi, F. (1998). Macroscopic and structural consequences of high-pressure treatment of ovalbumin solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3521-3527.
- [35] Ngarize, S., Herman, H., Adams, A., & Howell, N. (2004). Comparison of changes in the secondary structure of unheated, heated, and high-pressure-treated β -lactoglobulin and ovalbumin proteins using Fourier transform Raman spectroscopy and self-deconvolution. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(21), 6470-6477.
- [36] Huntington, J. A., & Stein, P. E. (2001). Structure and properties of ovalbumin. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 756(1), 189-198.

- [37] Arzeni, C., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. (2012). Functionality of egg white proteins as affected by high intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 308-316.
- [38] Schade, A. L., & Caroline, L. (1944). Raw hen egg white and the role of iron in growth inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (Washington)*, 100, 14-15.
- [39] Alderton, G., Ward, W. H., & Fevold, H. L. (1946). Identification of the bacteria-inhibiting, ironbinding protein of egg white as conalbumin. *Arch. Biochem.*, 11, 9-13.
- [40] Schade, A. L., & Caroline, L. (1946). An iron-binding component in human blood plasma. *Science (Washington)*, 104, 340-341.
- [41] Nakamura, R., & Doi, E. (2000). Egg processing. In: Nakai, S., Modler, H. W. (Eds). *Food proteins: processing applications* (pp. 171-207). New York, Wiley-VCH.
- [42] Kilara, A., & Harwalkar, V. R. (1996). Denaturation: egg proteins. In: Nakai, S., Modler, H. W. (Eds). *Food proteins: properties and characterization* (pp. 136-148). New York, N.Y. VCH.
- [43] Ahn, D. (2011). *Egg Components*, Animal Science Department, Iowa State University. Preuzeto sa <http://www.public.iastate.edu>.
- [44] Anson M.L. (1951). *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press Inc., New York
- [45] Wu, J., & Acero-Lopez, A. (2012). Ovotransferrin: structure, bioactivities, and preparation. *Food Research International*, 46(2), 480-487.
- [46] Moon, S. H., Lee, J. H., Ahn, D. U., & Paik, H. D. (2015). In vitro antioxidant and mineral-chelating properties of natural and autocleaved ovotransferrin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(10), 2065-2070.
- [47] Ibrahim, H. R., Hoq, M. I., & Aoki, T. (2007). Ovotransferrin possesses SOD-like superoxide anion scavenging activity that is promoted by copper and manganese binding. *International journal of biological macromolecules*, 41(5), 631-640.
- [48] Majumder, K., Chakrabarti, S., Davidge, S. T., & Wu, J. (2013). Structure and activity study of egg protein ovotransferrin derived peptides (IRW and IQW) on endothelial inflammatory response and oxidative stress. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(9), 2120-2129.

- [49] Ibrahim, H. R., & Kiyono, T. (2009). Novel anticancer activity of the autocleaved ovotransferrin against human colon and breast cancer cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(23), 11383-11390.
- [50] Lee, N. Y., Cheng, J.T., Enomoto, T. & Nakano, Y. (2006). One peptide derived from hen ovotransferrin as pro-drug to inhibit angiotensin converting enzyme. *Journal of Food and Drug Analysis*, 14(1), 31-35.
- [51] Moon, S. H., Lee, J. H., Kim, J. H., Paik, H. D., & Ahn, D. U. (2017). In vitro cytotoxic and ACE-inhibitory activities of promod 278P hydrolysate of ovotransferrin from chicken egg white. *Poultry Science*, 96(6), 1982-1987.
- [52] Giansanti, F., Rossi, P., Massucci, M. T., Botti, D., Antonini, G., Valenti, P., & Seganti, L. (2002). Antiviral activity of ovotransferrin discloses an evolutionary strategy for the defensive activities of lactoferrin. *Biochemistry and cell biology*, 80(1), 125-130.
- [53] Julià, S., Sánchez, L., Pérez, M. D., Lavilla, M., Conesa, C., & Calvo, M. (2007). Effect of heat treatment on hen's egg ovomucoid: An immunochemical and calorimetric study. *Food research international*, 40(5), 603-612.
- [54] Salahuddin, A., & Baig, M. A. (1985). Homologous structural domains in chicken egg-white ovomucoid: Characterization and acid denaturation. *Journal of Biosciences*, 8(1), 67-87.
- [55] Laskowski, M, Jr., Tashiro, M., Empire, M. W., Park, S. J., Kato, I., Ardelt, W. & Wieczorek, M. (1983), In N. Katanuma, H. Umezawa & H. Holzer (Eds.), *Proteinase Inhibitors: Medical and Biological Aspects* (pp. 55). Japan Scientific Societies Press, Tokyo/Springer,Verlag, Berlin.
- [56] Stein, J. P., Catterall, J. F., Kristo, P., Means, A. R., & O'Malley, B. W. (1980). Ovomucoid intervening sequences specify functional domains and generate protein polymorphism. *Cell*, 21(3), 681-687.
- [57] Eichholz, A., (1898). The Hydrolysis of Proteids. *The Journal of Physiology*, 23, 163.
- [58] Omana, D. A., Wang, J., & Wu, J. (2010). Ovomucin—a glycoprotein with promising potential. *Trends in food science & technology*, 21(9), 455-463.
- [59] Hammershøj, M., Nebel, C., & Carstens, J. H. (2008). Enzymatic hydrolysis of ovomucin and effect on foaming properties. *Food Research International*, 41(5), 522-531.

[60] Nakamura, R., & Sato, Y. (1964). Studies on the foaming property of the chicken egg white. *Agricultural and Biological Chemistry*, 28(8), 524-529.

[61] Shinobu, O. D. A., YAMANAKA, Y., MATSUDOMI, N., & KOBAYASHI, K. (1985). Functional and structural properties of ovomucin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(12), 3501-3504.

[62] Wang, J., & Wu, J. (2012). Effect of operating conditions on the extraction of ovomucin. *Process Biochemistry*, 47(1), 94-98.

[63] Robinson, D. S., & Monsey, J. B. (1964). Reduction of ovomucin by mercaptoethanol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Mucoproteins and Mucopolysaccharides*, 83(3), 368-370.

[64] Hayakawa, S., & Sato, Y. (1976). Studies on the dissociation of the soluble ovomucin by sonication. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40(12), 2397-2404.

[65] Hiidenhovi, J. (2007). Ovomucin. In R. Huopalahti, R. Lopez-Fandino, M. Anton, & R. Schade (Eds.), *Bioactive egg compounds* (pp. 61-68). Germany: Springer Verlag.

[66] Lesnierowski, G., Kijowski, J. (2007). Lysozyme, In: Huopalahti, R., MyiLibrary., & Coutts Information Services. (Eds), *Bioactive Egg Compounds* (pp. 33-42). Berlin; New York:

Springer.

[67] Iametti, S., Donnizzelli, E., Pittia, P., Rovere, P. P., Squarcina, N., & Bonomi, F. (1999). Characterization of high-pressure-treated egg albumen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3611-3616.

[68] Mine, Y., & D'Silva, I. (2008). Bioactive components in egg white. *Egg bioscience and biotechnology*, 141-184.

[69] Strzelczyk, P., Bujacz, A., Plażuk, D., Zakrzewski, J., & Bujacz, G. (2013). Structural investigation of the interactions of biotinylruthenocene with avidin. *Chemico-biological interactions*, 204(1), 6-12.

[70] Marttila, A. T., Airenne, K. J., Laitinen, O. H., Kulik, T., Bayer, E. A., Wilchek, M., & Kulomaa, M. S. (1998). Engineering of chicken avidin: a progressive series of reduced charge mutants. *FEBS letters*, 441(2), 313-317.

[71] Liu, W. H., Means, G. E., & Feeney, R. E. (1971). The inhibitory properties of avian ovoinhibitors against proteolytic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 229(1), 176-185.

[72] Zahnley, J. C. (1974). Evidence That the Two Binding Sites for Trypsin on Chicken Ovoinhibitor Are Not Equivalent Dissociation Of The Complexes With Porcine Trypsin. *Journal of Biological Chemistry*, 249(13), 4282-4285.

[73] Stevens, L. (1991). Egg white proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 100(1), 1-9.

[74] Anastasi, A., Brown, M. A., Kembhavi, A. A., Nicklin, M. J. H., Sayers, C. A., Sunter, D. C., & Barrett, A. J. (1983). Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum. *Biochemical Journal*, 211(1), 129-138.

[75] Bode, W., Engh, R., Musil, D., Thiele, U., Huber, R., Karshikov, A., ... & Turk, V. (1988). The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *The EMBO journal*, 7(8), 2593-2599.

[76] Nagase, H., Harris, E. D., Woessner, J. F., & Brew, K. (1983). Ovostatin: a novel proteinase inhibitor from chicken egg white. I. Purification, physicochemical properties, and tissue distribution of ovostatin. *Journal of Biological Chemistry*, 258(12), 7481-7489.

[77] Hamazume, Y., Mega, T., & Ikenaka, T. (1987). Positions of disulfide bonds in riboflavin protein of hen egg white. *The Journal of Biochemistry*, 101(1), 217-223.

[78] Miller, M. S., Mas, M. T., & White, H. B. (1984). Highly phosphorylated region of chicken riboflavin-binding protein: chemical characterization and phosphorus-31 NMR studies. *Biochemistry*, 23(3), 569-576.

[79] Czechowska-Biskup, R., Rokita, B., Lotfy, S., Ulanski, P., & Rosiak, J. M. (2005). Degradation of chitosan and starch by 360-kHz ultrasound. *Carbohydrate Polymers*, 60(2), 175-184.

[80] Knorr, D., Froehling, A., Jaeger, H., Reineke, K., Schlueter, O., & Schoessler, K. (2011). Emerging technologies in food processing. *Annual review of food science and technology*, 2, 203-235.

- [81] Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7), 323-331.
- [82] Yusaf, T., & Al-Juboori, R. A. (2014). Alternative methods of microorganism disruption for agricultural applications. *Applied Energy*, 114, 909-923.
- [83] Mason, T. (1998). Power ultrasound in food processing—the way. *Ultrasound in food processing*, 105.
- [84] J Mason, T., Chemat, F., & Vinatoru, M. (2011). The extraction of natural products using ultrasound or microwaves. *Current Organic Chemistry*, 15(2), 237-247.
- [85] Piyasena, P., Mohareb, E., & McKellar, R. C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International journal of food microbiology*, 87(3), 207-216.
- [86] Leighton, T. (1998). The principles of cavitation. In M. J. W. Povey & T. J. Mason (Eds.), *Ultrasound in food processing* (pp 151-178). London, Blackie, Academic & Professional.
- [87] O’Sullivan, J. J., Park, M., Beevers, J., Greenwood, R. W., & Norton, I. T. (2017). Applications of ultrasound for the functional modification of proteins and nanoemulsion formation: a review. *Food Hydrocolloids*, 71, 299-310.
- [88] Zheng, L., & Sun, D. W. (2006). Innovative applications of power ultrasound during food freezing processes—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 17(1), 16-23.
- [89] Güzey, D., Gülseren, İ., Bruce, B., & Weiss, J. (2006). Interfacial properties and structural conformation of thermosonicated bovine serum albumin. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 669-677.
- [90] O’Brien, W. D. (2007). Ultrasound–biophysics mechanisms. *Progress in biophysics and molecular biology*, 93(1), 212-255.
- [91] O’donnell, C. P., Tiwari, B. K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2010). Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in food science & technology*, 21(7), 358-367.
- [92] Gong, C., & Hart, D. P. (1998). Ultrasound induced cavitation and sonochemical yields. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 104(5), 2675-2682.

- [93] Ashokkumar, M., & Grieser, F. (1999). Ultrasound assisted chemical processes. *Reviews in Chemical Engineering*, 15(1), 41.
- [94] Mason, T. J., Paniwnyk, L., & Lorimer, J. P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics sonochemistry*, 3(3), S253-S260.
- [95] Yariv, I., Lipovsky, A., Gedanken, A., Lubart, R., & Fixler, D. (2015). Enhanced pharmacological activity of Vitamin B12 and penicillin as nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 10, 3593-3601.
- [96] Vajnhandl, S., & Le Marechal, A. M. (2005). Ultrasound in textile dyeing and the decolouration/mineralization of textile dyes. *Dyes and Pigments*, 65(2), 89-101.
- [97] Chowdhury, P., & Viraraghavan, T. (2009). Sonochemical degradation of chlorinated organic compounds, phenolic compounds and organic dyes—a review. *Science of the total environment*, 407(8), 2474-2492.
- [98] Ensminger, D. E. (1986). Acoustic dewatering. *Advances in Solid-Liquid Separation*, Batelle Press, Columbus, OH.
- [99] Nyborg, W. L. (1965). Acoustic streaming. *Physical acoustics*, 2(Pt B), 265-331.
- [100] Young, F. R. (1999). *Cavitation*. World Scientific.
- [101] Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Álvarez, C., & O'Donnell, C. P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 60-67.
- [102] Chen, D. (2012) Applications of ultrasound in water and wastewater treatment. In: Chen D, Sharma SK, Mudhoo A (Eds.) *Handbook on application of ultrasound: sonochemistry for sustainability*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- [103] McClements, D. J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science & Technology*, 6(9), 293-299.
- [104] Yasuda, K., & Koda, S. (2011). Development of sonochemical reactor. In *Handbook on Applications of Ultrasound: Sonochemistry for Sustainability*. CRC Press.
- [105] Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2011). Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(5), 951-957.
- [106] Lorimer, J. P., & Mason, T. J. (1987). Sonochemistry. Part 1—the physical aspects. *Chemical Society Reviews*, 16, 239-274.

[107] Patist, A., & Bates, D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative food science & emerging technologies*, 9(2), 147-154.

[108] Henglein, A. (1993). Contributions to various aspects of cavitation chemistry. *Advances in sonochemistry*, 3, 17-83.

[109] Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilku, K., & Versteeg, C. K. (2008). Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 155-160.

[110] Chang, A. C., & Chen, F. C. (2002). The application of 20 kHz ultrasonic waves to accelerate the aging of different wines. *Food Chemistry*, 79(4), 501-506.

[111] Wu, H., Hulbert, G. J., & Mount, J. R. (2000). Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(3), 211-218.

[112] Berlan, J., Trabelsi, F., Delmas, H., Wilhelm, A. M., & Petrigani, J. F. (1994). Oxidative degradation of phenol in aqueous media using ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1(2), S97-S102.

[113] Lieu, L. N. (2010). Application of ultrasound in grape mash treatment in juice processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(1), 273-279.

[114] Bosiljkov, T., Tripalo, B., Brnčić, M., Ježek, D., Karlović, S., & Jaguš, I. (2011). Influence of high intensity ultrasound with different probe diameter on the degree of homogenization (variance) and physical properties of cow milk. *African Journal of Biotechnology*, 10(1), 34-41.

[115] Capote, F. P., & de Castro, M. L. (2007). *Analytical applications of ultrasound* (Vol. 26). Elsevier.

[116] Adewuyi, Y. G. (2001). Sonochemistry: environmental science and engineering applications. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40(22), 4681-4715.

[117] Peters, D. (1996). Ultrasound in materials chemistry. *Journal of materials chemistry*, 6(10), 1605-1618.

[118] Muthukumaran, S., Kentish, S. E., Stevens, G. W., & Ashokkumair, M. (2006). Application of ultrasound in membrane separation processes: a review. *Reviews in chemical engineering*, 22(3), 155.-194.

[119] Gang, X., Hong, Z., & Jian, H. (2000). Leaching method of flavone from bamboo leaves. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 28(7), 857-859.

[120] Behrend, O., & Schubert, H. (2001). Influence of hydrostatic pressure and gas content on continuous ultrasound emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 271-276.

[121] Mason, T. J., & Luche, J. L. (1997). Ultrasound as a new tool for synthetic chemists. In *Chemistry under extreme and non-classical conditions* (p. 64). John Wiley & Sons Inc., New York, USA.

[122] McClements, D. J., & Gunasekaran, S. (1997). Ultrasonic characterization of foods and drinks: principles, methods, and applications. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 37(1), 1-46.

[123] Povey, M. J. W., & Mason, T. J. (1998). Ultrasound in food processing. Blackie Academic and Professional. *London, United Kingdom*.

[124] Withers, P. M. (1996). Ultrasonic, acoustic and optical techniques for the non-invasive detection of fouling in food processing equipment. *Trends in food science & technology*, 7(9), 293-298.

[125] Villamiel, M., & de Jong, P. (2000). Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Trypticase® Soy Broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating. *Journal of food engineering*, 45(3), 171-179.

[126] Thakur, B. R., & Nelson, P. E. (1997). Inactivation of lipoxygenase in whole soy flour suspension by ultrasonic cavitation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 41(5), 299-301.

[127] Roberts, R. T. (1993). High intensity ultrasonics in food processing. *Chemistry and Industry*, (4), 119-21.

[128] Li, B., & Sun, D. W. (2002). Effect of power ultrasound on freezing rate during immersion freezing of potatoes. *Journal of Food Engineering*, 55(3), 277-282.

[129] Sastry, S. K., Shen, G. Q., & Blaisdell, J. L. (1989). Effect of Ultrasonic Vibration on Fluid-to-Particle Convective Heat Transfer Coefficients. *Journal of Food Science*, 54(1), 229-230.

[130] Lima, M., & Sastry, S. K. (1990). Influence of Fluid Rheological Properties and Particle Location on Ultrasound-assisted Heat Transfer between Liquid and Particles. *Journal of food Science*, 55(4), 1112-1115.

[131] Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.

[132] Karki, B., Lamsal, B. P., Jung, S., van Leeuwen, J. H., Pometto, A. L., Grewell, D., & Khanal, S. K. (2010). Enhancing protein and sugar release from defatted soy flakes using ultrasound technology. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 270-278.

[133] Wang, L., & Wang, Y. J. (2004). Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 291-296.

[134] Floros, J. D., & Liang, H. (1994). Acoustically assisted diffusion through membranes and biomaterials. *Food Technology*, 48(12), 79-84.

[135] Bittner, B., Morlock, M., Koll, H., Winter, G., & Kissel, T. (1998). Recombinant human erythropoietin (rhEPO) loaded poly (lactide-co-glycolide) microspheres: influence of the encapsulation technique and polymer purity on microsphere characteristics. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 45(3), 295-305.

[136] Wolf, M., Wirth, M., Pittner, F., & Gabor, F. (2003). Stabilisation and determination of the biological activity of L-asparaginase in poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanospheres. *International journal of pharmaceuticals*, 256(1), 141-152.

[137] Chen, S., Berthelie, V., Yang, W., & Wetzel, R. (2001). Polyglutamine aggregation behavior in vitro supports a recruitment mechanism of cytotoxicity. *Journal of molecular biology*, 311(1), 173-182.

[138] Soto, C., Saborio, G. P., & Anderes, L. (2002). Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends in neurosciences*, 25(8), 390-394.

[139] Vercet, A., Burgos, J., Crelier, S., & Lopez-Buesa, P. (2001). Inactivation of proteases and lipases by ultrasound. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(2), 139-150.

[140] Manas, P., Munoz, B., Sanz, D., & Condon, S. (2006). Inactivation of lysozyme by ultrasonic waves under pressure at different temperatures. *Enzyme and microbial technology*, 39(6), 1177-1182.

[141] Kang, D. C., Gao, X. Q., Ge, Q. F., Zhou, G. H., & Zhang, W. G. (2017). Effects of ultrasound on the beef structure and water distribution during curing through protein degradation and modification. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 317-325.

[142] Delgado, A. E., Zheng, L., & Sun, D. W. (2009). Influence of ultrasound on freezing rate of immersion-frozen apples. *Food and Bioprocess Technology*, 2(3), 263-270.

[143] Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., & Krešić, G. (2010). Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of α -lactalbumin. *LWT-Food Science and Technology*, 43(2), 254-262.

[144] Hu, H., Wu, J., Li-Chan, E. C., Zhu, L., Zhang, F., Xu, X., ... & Pan, S. (2013). Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. *Food Hydrocolloids*, 30(2), 647-655.

[145] Zhao, Y. Y., Wang, P., Zou, Y. F., Li, K., Kang, Z. L., Xu, X. L., & Zhou, G. H. (2014). Effect of pre-emulsification of plant lipid treated by pulsed ultrasound on the functional properties of chicken breast myofibrillar protein composite gel. *Food Research International*, 58, 98-104.

[146] Hu, Y., Yu, H., Dong, K., Yang, S., Ye, X., & Chen, S. (2014). Analysis of the tenderisation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) meat by ultrasonic treatment using response surface methodology. *Food chemistry*, 160, 219-225.

[147] Cao, S., Hu, Z., Pang, B., Wang, H., Xie, H., & Wu, F. (2010). Effect of ultrasound treatment on fruit decay and quality maintenance in strawberry after harvest. *Food Control*, 21(4), 529-532.

[148] São José, J. F. B., & Vanetti, M. C. D. (2012). Effect of ultrasound and commercial sanitizers in removing natural contaminants and *Salmonella enterica* Typhimurium on cherry tomatoes. *Food Control*, 24(1), 95-99.

[149] Chandrapala, J., Martin, G. J., Kentish, S. E., & Ashokkumar, M. (2014). Dissolution and reconstitution of casein micelle containing dairy powders by high shear using ultrasonic and physical methods. *Ultrasonics sonochemistry*, 21(5), 1658-1665.

[150] McCarthy, N. A., Kelly, P. M., Maher, P. G., & Fenelon, M. A. (2014). Dissolution of milk protein concentrate (MPC) powders by ultrasonication. *Journal of Food Engineering*, 126, 142-148.

[151] Yanjun, S., Jianhang, C., Shuwen, Z., Hongjuan, L., Jing, L., Lu, L., ... & Jiaping, L. (2014). Effect of power ultrasound pre-treatment on the physical and functional properties of reconstituted milk protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, 124, 11-18.

[152] Zisu, B., Bhaskaracharya, R., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2010). Ultrasonic processing of dairy systems in large scale reactors. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(6), 1075-1081.

[153] Shanmugam, A., Chandrapala, J., & Ashokkumar, M. (2012). The effect of ultrasound on the physical and functional properties of skim milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 251-258.

[154] Martini, S., Potter, R., & Walsh, M. K. (2010). Optimizing the use of power ultrasound to decrease turbidity in whey protein suspensions. *Food Research International*, 43(10), 2444-2451.

[155] Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Paniwnyk, L., & Herceg, Z. (2014). Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. *Journal of Food engineering*, 121, 15-23.

[156] Gülseren, İ., Güzey, D., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2007). Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(2), 173-183.

[157] Jia, J., Ma, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., Luo, L., & He, R. (2010). The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*, 119(1), 336-342.

[158] Charoensuk, D., Wilailuk, C., & Wanlop, C. (2014). Effect of high intensity ultrasound on physicochemical and functional properties of whey protein isolate and mung

bean protein isolate. In *The 26th annual meeting of the thai society for biotechnology and international conferenc* (pp. 394-401).

[159] Jiang, L., Wang, J., Li, Y., Wang, Z., Liang, J., Wang, R., ... & Zhang, M. (2014). Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. *Food Research International*, 62, 595-601.

[160] O'Sullivan, J., Murray, B., Flynn, C., & Norton, I. (2016). The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. *Food Hydrocolloids*, 53, 141-154.

[161] Zhang, H., Claver, I. P., Zhu, K. X., & Zhou, H. (2011). The effect of ultrasound on the functional properties of wheat gluten. *Molecules*, 16(5), 4231-4240.

[162] Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 463-472.

[163] Krise, K. M. (2011). *The effects of microviscosity, bound water and protein mobility on the radiolysis and sonolysis of hen egg white* (Doctoral dissertation, The Pennsylvania State University).

[164] McMurry, J. E. (2011). *Organic Chemistry* (8th ed.). Brooks/Cole.

[165] O'Sullivan, J., Arellano, M., Pichot, R., & Norton, I. (2014). The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of dairy proteins. *Food Hydrocolloids*, 42, 386-396.

[166] JinCai, Z., ShaoYing, Z., & RiXian, Y. (2013). Ultrasonic enhanced walnut protein emulsifying property. *Journal of Food Processing and Technology*, 4(7).

[167] Chen, L., Chen, J. S., Yu, L., Wu, K. G., Liu, X. L., & Chai, X. H. (2012). Modifications of soy protein isolates using ultrasound treatment for improved emulsifying properties. In *Advanced Materials Research* (Vol. 554, pp. 944-948). Trans Tech Publications.

[168] Madadlou, A., Mousavi, M. E., Emam-djomeh, Z., Ehsani, M., & Sheehan, D. (2009). Sonodisruption of re-assembled casein micelles at different pH values. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(5), 644-648.

[169] O'Sullivan, J., Pichot, R., & Norton, I. T. (2014). Protein stabilised submicron emulsions. *Gums and stabilisers for the food industry*, 17, 223-229.

[170] Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Chen, J., Sun, Y., Su, Y., ... & Lv, J. (2013). Effects of microwave and ultrasound pretreatments on enzymolysis of milk protein concentrate with different enzymes. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(11), 2250-2257.

[171] Barukčić, I., Jakopović, K. L., Herceg, Z., Karlović, S., & Božanić, R. (2015). Influence of high intensity ultrasound on microbial reduction, physico-chemical characteristics and fermentation of sweet whey. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 94-101.

[172] Guzey, D., & Weiss, J. (2001). High-intensity ultrasonic processing improves emulsifying properties of proteins. *Colloidal and Interfacial Food Science Laboratory, Department of Food Science and Technology, The University of Tennessee, 2605*, 37996-1071.

[173] Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Herceg, Z., & Herceg, I. L. (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 86(2), 281-287.

[174] Jambrak, A. R., Lelas, V., Mason, T. J., Krešić, G., & Badanjak, M. (2009). Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 386-393.

[175] Karki, B., Lamsal, B. P., Jung, S., van Leeuwen, J. H., Pometto, A. L., Grewell, D., & Khanal, S. K. (2010). Enhancing protein and sugar release from defatted soy flakes using ultrasound technology. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 270-278.

[176] Chen, L., Chen, J., Wu, K., & Yu, L. (2016). Improved low pH emulsification properties of glycated peanut protein isolate by ultrasound Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(27), 5531-5538.

[177] Huang, L., Zhang, X., Li, Y., Ji, D., & Ma, H. (2016). Subunit dissociation of peanut protein isolate induced by coupled ultrasound-acid pretreatment. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 32(18), 285-290.

[178] Smith, E., & Dent, G. (2013). *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. John Wiley & Sons.

[179] Herrero, A. M. (2008). Raman spectroscopy for monitoring protein structure in muscle food systems. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(6), 512-523.

[180] Dong, J., Dinakarpanian, D., & Carey, P. R. (1998). Extending the Raman analysis of biological samples to the 100 micromolar concentration range. *Applied spectroscopy*, 52(8), 1117-1122.

[181] Pelton, J. T., & McLean, L. R. (2000). Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Analytical biochemistry*, 277(2), 167-176.

[182] Placzek, G. (1934). *Rayleigh-streuung und Raman-effekt* (Vol. 2). Akad. Verlag-Ges..

[183] Beattie, R. J., Bell, S. J., Farmer, L. J., Moss, B. W., & Patterson, D. (2004). Preliminary investigation of the application of Raman spectroscopy to the prediction of the sensory quality of beef silverside. *Meat Science*, 66(4), 903-913.

[184] Badii, F., & Howell, N. K. (2006). Fish gelatin: structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 630-640.

[185] Li-Chan, E. C. (2007). Vibrational spectroscopy applied to the study of milk proteins. *Le Lait*, 87(4-5), 443-458.

[186] Ngarize, S., Adams, A., & Howell, N. K. (2004). Studies on egg albumen and whey protein interactions by FT-Raman spectroscopy and rheology. *Food Hydrocolloids*, 18(1), 49-59.

[187] Ngarize, S., Adams, A., & Howell, N. (2005). A comparative study of heat and high pressure induced gels of whey and egg albumen proteins and their binary mixtures. *Food Hydrocolloids*, 19(6), 984-996.

[188] Smith, D., Galazka, V. B., Wellner, N., & Sumner, I. G. (2000). High pressure unfolding of ovalbumin. *International journal of food science & technology*, 35(4), 361-370.

[189] Zayas, J. F. (1997). Solubility of proteins. In *Functionality of proteins in food* (pp. 6-75). Springer Berlin Heidelberg.

[190] Kinsella, J. E. (1982). Relationships between structure and functional properties of food proteins. *Food proteins*, 1, 51-103.

[191] Pomeranz, Y. (1985). *Functional Properties of Food Components* (pp. 170-189), Academic Press, San Diego, California.

[192] Kneifel, W., Paquin, P., Abert, T., & Richard, J. P. (1991). Water-holding capacity of proteins with special regard to milk proteins and methodological aspects—A review. *Journal of Dairy Science*, 74(7), 2027-2041.

[193] Phillips R. D. & Beuchat L. R. (1981). Enzyme modification of proteins. In J. P. Cherry (Ed.), *Protein functionality in food* (pp. 275-298), ACS Symposium Series, 147.

[194] Barbut S. (1994). Protein gel ultrastructure and functionality, *Protein functionality in food systems*, New York, Marcel Dekker Inc.

[195] Kinsella, J. E. (1990). *Advances in food and nutrition research* (Vol. 33). Academic Press.

[196] Renkema, J. M. S. (2001). *Formation, structure and rheological properties of soy protein gels*. Wageningen University, Holandija, doktorska disertacija.

[197] deMan John M. (1999). *Principles of Food Chemistry* (pp. 118-120) (3rd ed.). An Aspen Publication.

[198] Holt, C. (2000). Molecular basis of whey protein food functionalities. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55(2), 53-55.

[199] Timasheff, S. N. (1993). The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 22(1), 67-97.

[200] Creighton, T. E. (1993). *Proteins: structures and molecular properties*. Macmillan.

[201] Damodaran, S. (2008). *Amino acids, peptides, and proteins* (Vol. 4, pp. 217-329). CRC Press: Boca Raton, FL.

[202] Tanford, C. (1991). *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*. Malabar, FL, Krieger Publishing Company.

[203] Phillips, L. G., Whitehead, D. M., & Kinsella, J. E. (1994). Structure– function properties of food proteins. San Diego, CA: Academic Press.

[204] Loncin, M. A. M. R. L. (1979). *Food Engineering, Principles and Selected Applications*. New York, Academic Press.

[205] Nakai, S., & Li-Chan, E. (1989). Effects of heating on protein functionality. *Protein quality and the effects of processing*, 125-144.

[206] Lenarski, I. I. (1960). Denaturation of proteins and conditions for the heat treatment and drying of grain. In V. L. Kretovich (Ed.), *Biochemistry of Grain and Breadmaking* (pp 53-63), Izdatelstvo Akademii Nauk SSSR, Moscow, Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem.

[207] Zhang, H. Q., Barbarosa-Cánovas, G. V., Balasubramaniam, V. M., Dunne, C. P., Farkas, D. F., Yuan, J. T. C. (Eds.). (2007), *Nonthermal Processing Technology for Food*, Wiley-Blackwell, UK.

[208] Vassilenko, K. S., & Uversky, V. N. (2002). Native-like secondary structure of molten globules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1594(1), 168-177.

[209] Kuwajima, K. (1989). The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 6(2), 87-103.

[210] Cornec, M., Kim, D. A., & Narsimhan, G. (2001). Adsorption dynamics and interfacial properties of α -lactalbumin in native and molten globule state conformation at air–water interface. *Food Hydrocolloids*, 15(3), 303-313.

[211] Hirose, M. (1993). Molten globule state of food proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 4(2), 48-51.

[212] Hirose, M., Nishizawa, Y., & Lee, J. Y. (1990). Gelation of bovine serum albumin by glutathione. *Journal of Food Science*, 55(4), 915-917.

[213] Chen, C. J., Liao, H. J., Okechukwu, P. E., Damodaran, S. & Rao, M. A. (1996). Rheological properties of heated corn starch plus soybean 7s and 11s globulin dispersions. *Journal of Texture Studies*, 27(4), 419-432.

[214] Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry* 4th revised and extended edition.

[215] Foegeding, E. A., Luck, P. J., & Davis, J. P. (2006). Factors determining the physical properties of protein foams. *Food Hydrocolloids*, 20(2), 284-292.

[216] Kuan, Y. H., Bhat, R., & Karim, A. A. (2011). Emulsifying and foaming properties of ultraviolet-irradiated egg white protein and sodium caseinate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(8), 4111-4118.

[217] Damodaran, S., Anand, K., & Razumovsky, L. (1998). Competitive adsorption of egg white proteins at the air– water interface: Direct evidence for electrostatic complex formation between lysozyme and other egg proteins at the interface. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 46(3), 872-876.

[218] Lau, K., & Dickinson, E. (2004). Structural and rheological properties of aerated high sugar systems containing egg albumen. *Journal of food science*, 69(5), E232-E239.

[219] Macherey, L. N., Conforti, F. D., Eigel III, W., & O’Keefe, S. F. (2011). Use of *Mucor miehei* lipase to improve functional properties of yolk-contaminated egg whites. *Journal of food science*, 76(4), C651-C655.

[220] Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2004). *Food Chemistry* 3rd rev, Berlin London, Springer.

[221] Ali, N. A., Ahmed, S. H., Mohamed, E. A., & Ahmed, I. A. M. (2010). Effect of transglutaminase cross linking on the functional properties as a function of NaCl concentration of legumes protein isolate.

[222] Van der Plancken, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. E. (2007). Foaming properties of egg white proteins affected by heat or high pressure treatment. *Journal of Food Engineering*, 78(4), 1410-1426.

[223] Patino, J. M. R., Delgado, M. D. N., & Fernández, J. L. (1995). Stability and mechanical strength of aqueous foams containing food proteins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 99(1), 65-78.

[224] Girton, A. R., Macneil, J. H., & Anantheswaran, R. C. (1999). Effect of initial product temperature and initial pH on foaming time during vacuum evaporation of liquid whole eggs. *Poultry science*, 78(10), 1452-1458.

[225] Lomakina, K., & Mikova, K. (2006). A study of the factors affecting the foaming properties of egg white-a review. *Czech J. Food Sci*, 24(3), 110-118.

[226] Vega, C., & Sanghvi, A. (2012). Cooking literacy: meringues as culinary scaffoldings. *Food Biophysics*, 7(2), 103-113.

[227] Cho, D. Y., Jo, K., Cho, S. Y., Kim, J. M., Lim, K., Suh, H. J., & Oh, S. (2014). Antioxidant effect and functional properties of hydrolysates derived from egg-white protein. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 34(3), 362-371.

[228] Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 716-723.

[229] Chalamaiah, M., Rao, G. N., Rao, D. G., & Jyothirmayi, T. (2010). Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. *Food Chemistry*, 120(3), 652-657.

[230] Chen, C., Chi, Y. J., & Xu, W. (2012). Comparisons on the functional properties and antioxidant activity of spray-dried and freeze-dried egg white protein hydrolysate. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2342-2352.

[231] Campbell, L., Raikos, V., & Euston, S. R. (2003). Modification of functional properties of egg-white proteins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 47(6), 369-376.

[232] Arakawa, T., & Timasheff, S. N. (1985). Theory of protein solubility. *Methods in enzymology*, 114, 49-77.

[233] Riès-kautt, M., Ducruix, A. (1997). Inferences drawn from physicochemical studies of crystallogenesis and precrystalline state. In Carter C.W. Jr. (Ed.), *Methods in Enzymology* (pp. 23–59). Academic Press, New York.

[234] Bagby, S., Tong, K. I., Ikura, M., Thomas, V. D., James, L., Uli, S. (2001). Optimization of protein solubility and stability for protein nuclear magnetic resonance. In *Methods in Enzymology* (pp. 20–41.). Academic Press; New York.

[235] Schein, C. H. (1993). Solubility and secretability. *Current opinion in biotechnology*, 4(4), 456-461.

[236] Middaugh, C. R. & Volkin, D. B. (1992). Protein solubility. In: Ahern T. J., Manning M. C., (Eds.). *Stability of Protein Pharmaceuticals* (pp. 109–134). Plenum Press, New York.

[237] Garidel, P., & Kebbel, F. (2010). Protein therapeutics and aggregates characterized by photon correlation spectroscopy. *BioProcess Int*, 8(3), 38-46.

[238] Wang, W., Nema, S., & Teagarden, D. (2010). Protein aggregation—Pathways and influencing factors. *International journal of pharmaceutics*, 390(2), 89-99.

[239] Schumacher, K., Winter, G., & Mahler, M. C. (2003). Instabilitäten von Proteinarzneimitteln. *PZ PRISMA*, 10(1), 15-18.

[240] Le Brun, V., Friess, W., Bassarab, S., & Garidel, P. (2010). Correlation of protein-protein interactions as assessed by affinity chromatography with colloidal protein stability: a case study with lysozyme. *Pharmaceutical development and technology*, 15(4), 421-430.

[241] Ben-Naim, A. (1997). Solvation and solubility of globular proteins. *Pure and applied chemistry*, 69(11), 2239-2244.

[242] Saluja, A., & Kalonia, D. S. (2008). Nature and consequences of protein-protein interactions in high protein concentration solutions. *International journal of pharmaceutics*, 358(1), 1-15.

[243] Lange, C., & Rudolph, R. (2009). Suppression of protein aggregation by L-arginine. *Current pharmaceutical biotechnology*, 10(4), 408-414.

[244] Gomes, M. T. M. S., & Pelegrine, D. H. G. (2012). Solubility of egg white proteins: Effect of pH and temperature. *Intl J Food Engr*, 8(3), 1-6.

[245] Machado, F. F., Coimbra, J. S., Rojas, E. E. G., Minim, L. A., Oliveira, F. C., & Rita de Cássia, S. S. (2007). Solubility and density of egg white proteins: Effect of pH and saline concentration. *LWT-food Science and Technology*, 40(7), 1304-1307.

[246] Lai, K. M., Chuang, Y. S., Chou, Y. C., Hsu, Y. C., Cheng, Y. C., Shi, C. Y., ... & Hsu, K. C. (2010). Changes in physicochemical properties of egg white and yolk proteins from duck shell eggs due to hydrostatic pressure treatment. *Poultry science*, 89(4), 729-737.

[247] Van der Plancken, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. E. (2005). Combined effect of high pressure and temperature on selected properties of egg white proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(1), 11-20.

[248] Van der Plancken, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. E. (2005). Changes in sulfhydryl content of egg white proteins due to heat and pressure treatment. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(14), 5726-5733.

[249] Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.

[250] Martos, G., Contreras, P., Molina, E., & López-Fandiño, R. (2010). Egg white ovalbumin digestion mimicking physiological conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(9), 5640-5648.

[251] Van der Plancken, I., Delattre, M., Indrawati,, Van Loey, A., & Hendrickx, M. E. (2004). Kinetic study on the changes in the susceptibility of egg white proteins to enzymatic hydrolysis induced by heat and high hydrostatic pressure pretreatment. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(18), 5621-5626.

[252] Quirós, A., Chichón, R., Recio, I., & López-Fandiño, R. (2007). The use of high hydrostatic pressure to promote the proteolysis and release of bioactive peptides from ovalbumin. *Food Chemistry*, 104(4), 1734-1739.

[253] Seuss-baum, I. (2007). Nutritional evaluation of egg compounds. *Bioactive egg compounds*, 117-144.

[254] Hayashi, R., Kawamura, Y., Nakasa, T., & Okinaka, O. (1989). Application of high pressure to food processing: pressurization of egg white and yolk, and properties of gels formed. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(11), 2935-2939.

[255] Sternberg, M., Kim, C. Y., & Schwende, F. J. (1975). Lysinoalanine: presence in foods and food ingredients. *Science*, 190(4218), 992-994.

[256] Li-Chan, E., & Nakai, S. (1991). Importance of hydrophobicity of proteins in food emulsions.

[257] Brand, L. & Gohlke, J. R. (1972). Fluorescence probes for structure. In E. E. Snel (Ed.), *Annual Review of Biochemistry*. Annual Reviews Inc., California.

[258] Nakai, S., Li-Chan, E., Arteaga, G. E. (1996). Measurement of surface hydrophobicity. In G.M. Hall (Ed.), *Methods of Testing Protein Functionality*. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, London, UK.

[259] Stryer, L. (1965). The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin: A fluorescent probe of non-polar binding sites. *Journal of molecular biology*, 13(2), 482-495.

[260] Sawyer, W. H. (1968). Heat denaturation of bovine β -lactoglobulins and relevance of disulfide aggregation. *Journal of Dairy Science*, 51(3), 323-329.

[261] Arntfield, S. D., Murray, E. D. & Ismond, M. A. H. (1991). Role of disulfide bonds in determining the rheological and microstructural properties of heat-induced protein networks from ovalbumin and vicilin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1378-1385.

[262] Broersen, K., Van Teeffelen, A. M., Vries, A., Voragen, A. G., Hamer, R. J., & De Jongh, H. H. (2006). Do sulfhydryl groups affect aggregation and gelation properties of ovalbumin?. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(14), 5166-5174.

[263] Hoffmann, M. A., & van Mil, P. J. (1997). Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin: role of the free thiol group and disulfide bonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 2942-2948.

[264] Kitabatake, N., Wada, R., & Fujita, Y. (2001). Reversible conformational change in β -lactoglobulin A modified with N-ethylmaleimide and resistance to molecular aggregation on heating. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(8), 4011-4018.

[265] Anson, M. L. (1940). The reactions of iodine and iodoacetamide with native egg albumin. *The Journal of general physiology*, 23(3), 321-331.

[266] Huggins, C. & Jensen, E. V. (1949). Thermal coagulation of serum proteins; the effects of iodoacetate, iodoacetamide, and thiol compounds on coagulation. *Journal of Biological Chemistry*, 179(2), 645-654.

[267] Betz, S. F. (1993). Disulfide bonds and the stability of globular proteins. *Protein Science*, 2(10), 1551-1558.

[268] Zavodszky, M., Chen, C. W., Huang, J. K., Zolkiewski, M., Wen, L., & Krishnamoorthi, R. (2001). Disulfide bond effects on protein stability: Designed variants of Cucurbita maxima trypsin inhibitor-V. *Protein Science*, 10(1), 149-160.

[269] Sun, Y., & Hayakawa, S. (2002). Heat-induced gels of egg white/ovalbumins from five avian species: thermal aggregation, molecular forces involved, and rheological properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(6), 1636-1642.

[270] Klotz, I. M., & Heiney, R. E. (1962). Introduction of sulfhydryl groups into proteins using acetylmercaptosuccinic anhydride. *Archives of biochemistry and biophysics*, 96(3), 605-612.

[271] Xu, W., Kong, B. H., & Zhao, X. H. (2014). Optimization of some conditions of Neutrase-catalyzed plastein reaction to mediate ACE-inhibitory activity in vitro of casein hydrolysate prepared by Neutrase. *Journal of food science and technology*, 51(2), 276-284.

[272] Chi, Y., Tian, B., Sun, B., & Guo, M. (2006). Enzymatic hydrolysis conditions for egg white proteins, Bulletin of the Faculty of Agriculture Niigata University, 58(2), 143-146.

[273] Chobert, J. M., Sitohy, M., & Whitaker, J. R. (1987). Specific limited hydrolysis and phosphorylation of food proteins for improvement of functional and nutritional properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 64(12), 1704-1711.

[274] Graszkievicz, A., Zelazko, M., & Trziszka, T. (2010). Application of pancreatic enzymes in hydrolysis of egg-white proteins. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 60(1), 57-61.

[275] Wang, L., Mao, X., Cheng, X., Xiong, X., & Ren, F. (2010). Effect of enzyme type and hydrolysis conditions on the in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and ash content of hydrolysed whey protein isolate. *International journal of food science & technology*, 45(4), 807-812.

[276] Knežević-Jugović, Z. D. (2008). Enzimsko inženjerstvo. *Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd*.

[277] Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40(1), 43-81.

[278] Mahmoud, M. I., MALONE, W. T., & Cordle, C. T. (1992). Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *Journal of Food Science*, 57(5), 1223-1229.

[279] Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers.

[280] Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M., Sergent, M., & Phan-Tan-Luu, R. O. G. E. R. (1995). Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Science*, 60(5), 949-952.

[281] Ney, K. H. (1971). Prediction of bitterness of peptides from their amino acid composition. *Z. Lebensm Unters Forsch*, 147, 64-68.

[282] Pedersen, B. (1994). Removing bitterness from protein hydrolysates. *Food technology*, 45(10), 96-98.

[283] Ishibashi, N., Kuniki, K. A. T. O., Shigenaga, T., Shinoda, I., & Fukui, S. (1988). Role of the Hydrophobia Amino Acid Residue in the Bitterness of Peptides. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(1), 91-94.

[284] Minamiura, N., Matsumura, Y., & Yamamoto, T. (1972). Bitter peptides in the casein digests with bacterial proteinase II. A bitter peptide consisting of Tryptophan and Leucine. *Journal of biochemistry*, 72(4), 841-848.

[285] Aubes-Dafau, I., Capdevielle, J., Seris, J. L., & Combes, D. (1995). Bitter peptide from hemoglobin hydrolysate: isolation and characterization. *FEBS letters*, 364(2), 115-119.

[286] Fujimaki, M., Kato, H., Arai, S., & Yamashita, M. (1971). Application of microbial proteases to soybean and other materials to improve acceptability, especially through the formation of plastein. *Journal of Applied Bacteriology*, 34(1), 119-131.

[287] Wieser, H., & Belitz, H. D. (1975). Bitter peptides isolated from corn protein zein by hydrolysis with pepsin (author's transl). *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 159(6), 329-336.

[288] Hevia, P., & Olcott, H. S. (1977). Flavor of enzyme-solubilized fish protein concentrate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(4), 772-775.

[289] Raksakulthai, R., & Haard, N. F. (2003). Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(4), 401-445.

[290] Katz, F. R., Goldberg, I., & Williams, R. (1991). *Biotechnology and Food Ingredients*, Van Nostrand Reinhold, New York, USA, 195-198.

[291] Lee, K. D., Lo, C. G., & Warthesen, J. J. (1996). Removal of Bitterness from the Bitter Peptides Extracted from Cheddar Cheese with Peptidases from *Lactococcus lactis* ssp. cremoris SK111. *Journal of Dairy Science*, 79(9), 1521-1528.

[292] Kanekanian, A., Gallagher, J., & Evans, E. P. (2000). Casein hydrolysis and peptide mapping. *International journal of dairy technology*, 53(1), 1-5.

[293] van Oort, M. (2010). Enzymes in food technology—introduction. *Enzymes in Food Technology, Second edition*, 311.

[294] Silvestre, M. P. C. (1997). Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 60(2), 263-271.

[295] Cheftel, C., Ahern, M., Wang, D. I., & Tannenbaum, S. R. (1971). Enzymic solubilization of fish protein concentrate: batch studies applicable to continuous enzyme recycling processes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 19(1), 155-161.

[296] Scrimgeour, K. G. (1977). *Chemistry and control of enzyme reactions*, Academic press Ltd., London.

[297] Shahidi, F., Han, X. Q., & Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food chemistry*, 53(3), 285-293.

[298] Klomklao, S., Kishimura, H., & Benjakul, S. (2013). Use of viscera extract from hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*) for the production of protein hydrolysate from toothed ponyfish (*Gazza minuta*) muscle. *Food chemistry*, 136(2), 1006-1012.

[299] Klomklao, S., Benjakul, S., Kishimura, H., & Chaijan, M. (2011). 24kDa trypsin: A predominant protease purified from the viscera of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*). *Food chemistry*, 129(3), 739-746.

[300] Whitaker, J. R., & Stauffer, C. E. (1994). *Principles of Enzymology for the Food Sciences* (2nd edn). *Trends in Food Science and Technology*, 5(9), 304-304.

[301] Reichelt, J. (1983). *Industrial Enzymology: The Application of Enzymes In industry*. Nature Press.

[302] Guerard, F., Guimas, L., & Binet, A. (2002). Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19, 489-498.

[303] Choisnard, L., Froidevaux, R., Nedjar-Arroume, N., Lignot, B., Vercaigne-Marko, D., Krier, F., ... & Guillochon, D. (2002). Kinetic study of the appearance of an anti-bacterial peptide in the course of bovine haemoglobin peptic hydrolysis. *Biotechnology and applied biochemistry*, 36(3), 187-194.

[304] Pandey, A., Webb, C. Soccol, C. R., Larroche, C. (Eds.). (2006). *Enzyme Technology* (pp. 319-321), Springer, New York.

[305] Jellouli, K., Ghorbel-Bellaaj, O., Ayed, H. B., Manni, L., Agrebi, R., & Nasri, M. (2011). Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Process Biochemistry*, 46(6), 1248-1256.

[306] George-Okafor, U. O., Odibo, F. J. C. (2001). Purification and some properties of thermo-stable alkaline serine protease from Thermophilic *Bacillus* sp. Gs-3, *Journal of Biological Science* 11(4), 299-306.

[307] Asokan, S. & Jayanthi, C. (2010). Alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans*. *Journal of cell and Tissue Research*, 10(1), 2119.

[308] Ahern, K. & Rajagopal, I. (2012). *Biochemistry* (7th ed.). W.H. Freeman and Company, New York.

[309] Barrett, A. J., & Rawlings, N. D. (1995). Families and clans of serine peptidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 318(2), 247-250.

[310] Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chemical reviews*, 102(12), 4501-4524.

[311] Ward, O. P., Rao, M. B., & Kulkarni, A. (2009). Proteases, production. *Applied Microbiology*, 495-509.

[312] Siezen, R. J., de Vos, W. M., Leunissen, J. A., & Dijkstra, B. W. (1991). Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases. *Protein Engineering*, 4(7), 719-737.

[313] Siezen, R. J., Bruinenberg, P. G., Vos, P., Alen-Boerrigter, I. V., Nijhuis, M., Alting, A. C., ... & Vos, W. M. D. (1993). Engineering of the substrate-binding region of the subtilisin-like, cell-envelope proteinase of *Lactococcus lactis*. *Protein Engineering, Design and Selection*, 6(8), 927-937.

[314] Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(1), 15-32.

[315] Siezen, R. J., & Leunissen, J. A. (1997). Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein science*, 6(3), 501-523.

[316] Brik, A., & Wong, C. H. (2003). HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Organic & biomolecular chemistry*, 1(1), 5-14.

[317] Suguna, K., Padlan, E. A., Smith, C. W., Carlson, W. D., & Davies, D. R. (1987). Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: implications for a mechanism of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(20), 7009-7013.

[318] James, M. N., & Sielecki, A. R. (1986). Molecular structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 Å resolution. *Nature*, 319(6048), 33-38.

[319] Grudkowska, M., & Zagdanska, B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica-English Edition*-, 609-624.

[320] Domsalla, A., & Melzig, M. F. (2008). Occurrence and properties of proteases in plant latices. *Planta medica*, 74(07), 699-711.

[321] Barrett, A. J., & Rawlings, N. D. (1995). Evolutionary families of metalloproteinases. *Meth. Enzymol*, 248, 183-228.

[322] Lei, B., Majumder, K., Shen, S., & Wu, J. (2011). Effect of sonication on thermolysin hydrolysis of ovotransferrin. *Food chemistry*, 124(3), 808-815.

[323] Smith, E. L., DeLange, R. J., Evans, W. H., Landon, M., & Markland, F. S. (1968). Subtilisin Carlsberg V. The complete sequence; comparison with subtilisin BPN'; evolutionary relationships. *Journal of Biological Chemistry*, 243(9), 2184-2191.

[324] Schmitke, J. L., Stern, L. J., & Klibanov, A. M. (1997). The crystal structure of subtilisin Carlsberg in anhydrous dioxane and its comparison with those in water and acetonitrile. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(9), 4250-4255.

[325] Morita, H., Okamoto, A., Yamagata, Y., Kusumoto, K. I., Koide, Y., Ishida, H., & Takeuchi, M. (2009). Heterologous expression and characterization of CpI, OcpA, and novel serine-type carboxypeptidase OcpB from *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(2), 335-346.

[326] Delange, R. J., & Smith, E. L. (1971). 3 Leucine Aminopeptidase and Other N-Terminal Exopeptidases. *The enzymes*, 3, 81-118.

[327] Sträter, N., Sun, L., Kantrowitz, E. R., & Lipscomb, W. N. (1999). A bicarbonate ion as a general base in the mechanism of peptide hydrolysis by dizinc leucine aminopeptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 11151-11155.

[328] Sträter, N., & Lipscomb, W. N. (1995). Two-metal ion mechanism of bovine lens leucine aminopeptidase: active site solvent structure and binding mode of L-leucinal, a gem-diolate transition state analog, by X-ray crystallography. *Biochemistry*, 34(45), 14792-14800.

[329] Clapés, P., Pera, E., & Torres, J. L. (1997). Peptide bond formation by the industrial protease, neutrase, in organic media. *Biotechnology Letters*, 19(10), 1023-1026.

[330] Zhou, C., Ma, H., Ding, Q., Lin, L., Yu, X., Luo, L., ... & Yagoub, A. E. G. A. (2013). Ultrasonic pretreatment of corn gluten meal proteins and neutrase: Effect on protein

conformation and preparation of ACE (angiotensin converting enzyme) inhibitory peptides. *Food and Bioproducts processing*, 91(4), 665-671.

[331] Vasantha, N., Thompson, L. D., Rhodes, C., Banner, C., Nagle, J., & Filpula, D. (1984). Genes for alkaline protease and neutral protease from *Bacillus amyloliquefaciens* contain a large open reading frame between the regions coding for signal sequence and mature protein. *Journal of bacteriology*, 159(3), 811-819.

[332] Shimada, H., Honjo, M., Mita, I., Nakayama, A., Akaoka, A., Manabe, K., & Furutani, Y. (1985). The nucleotide sequence and some properties of the neutral protease gene of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of biotechnology*, 2(2), 75-85.

[333] Novinec, M., & Lenarčič, B. (2013). Papain-like peptidases: structure, function, and evolution. *Biomolecular concepts*, 4(3), 287-308.

[334] Sangeetha, K., & Abraham, T. E. (2006). Chemical modification of papain for use in alkaline medium. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 38(3), 171-177.

[335] Menard, R., Khouri, H. E., Plouffe, C., Dupras, R., Ripoll, D., Vernet, T., ... & Storer, A. C. (1990). A protein engineering study of the role of aspartate 158 in the catalytic mechanism of papain. *Biochemistry*, 29(28), 6706-6713.

[336] Kamphuis, I. G., Kalk, K. H., Swarte, M. B. A., & Drenth, J. (1984). Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 179(2), 233-256.

[337] Mamboya, E. A. F. (2012). Papain, a plant enzyme of biological importance: A review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(2), 99-104.

[338] Tiwari, B. K., Mason, T. J., Cullen, P. J., Brijesh, K. T., & Valdramidis, V. (2012). Ultrasound processing of fluid foods. *Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods*, 135-165.

[339] Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, 427.

[340] Marquez, M. C., & Vazquez, M. A. (1999). Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process biochemistry*, 35(1), 111-117.

[341] Qi, W., & He, Z. (2006). Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model. *Frontiers of Chemistry in China*, 1(3), 308-314.

[342] Elkhilil, E. A. I., El Tinay, A. H., Mohamed, B. E., & Elsheikh, E. A. (2001). Effect of malt pretreatment on phytic acid and in vitro protein digestibility of sorghum flour. *Food chemistry*, 72(1), 29-32.

[343] Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315.

[344] Shaw, D. J., & Costello, B. (1993). *Introduction to colloid and surface chemistry* (pp.174-199). Butterworth-Heinemann, Oxford.

[345] Mu, L., Zhao, M., Yang, B., Zhao, H., Cui, C., & Zhao, Q. (2010). Effect of ultrasonic treatment on the graft reaction between soy protein isolate and gum acacia and on the physicochemical properties of conjugates. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(7), 4494-4499.

[346] Shimada, K., & Cheftel, J. C. (1988). Determination of sulfhydryl groups and disulfide bonds in heat-induced gels of soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(1), 147-153.

[347] Riddles, P. W., Blakeley, R. L., & Zerner, B. (1979). Ellman's reagent: 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)—a reexamination. *Analytical biochemistry*, 94(1), 75-81.

[348] Škaljac, S. (2014), Uticaj različitih tehnoloških parametara na formiranje boje tradicionalne fermentisane kobasice (Petrovačka kobasica) tokom standardizacije bezbednosti i kvaliteta, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univezitet u Novom Sadu.

[349] CIE (1976), International Commission on Illumination, Colorimetry: Official Recommendation of the International Commission on Illumination Publication CIE No. (E-1.31), Paris, France, Bureau Central de la CIE.

[350] McGuire, R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27(12), 1254-1255.

[351] SRPS EN ISO5492 (2012). Senzorske analize. Rečnik.

[352] Özen, E., Yeniocak, M., Colak, M., Goktas, O., & Koca, İ. (2014). Colorability of wood material with *Punica granatum* and *Morus nigra* extracts. *BioResources*, 9(2), 2797-2807.

[353] Horwitz, W. (2000). *Official methods of analysis of the AOAC International* (Vol. 18). The Association.

[354] Mirmoghtadaie, L., Aliabadi, S. S., & Hosseini, S. M. (2016). Recent approaches in physical modification of protein functionality. *Food chemistry*, *199*, 619-627.

[355] Mishra, S., Mann, B., & Joshi, V. K. (2001). Functional improvement of whey protein concentrate on interaction with pectin. *Food Hydrocolloids*, *15*(1), 9-15.

[356] Xiong, W., Wang, Y., Zhang, C., Wan, J., Shah, B. R., Pei, Y., ... & Li, B. (2016). High intensity ultrasound modified ovalbumin: structure, interface and gelation properties. *Ultrasonics sonochemistry*, *31*, 302-309.

[357] Strohalm, J., Novotna, P., Houska, M., Kyhos, K., Vavreinova, S., ... & Gabrovská, D. (2000). Influence of high pressure treatment on rheological and other properties of egg white. *High Pressure Research*, *19*, 137-143.

[358] Richwin, A., Raasch, A., Teichgräber, P., & Knorr, D. (1992). Effects of combined temperature and high pressure treatment on the functionality of egg white proteins. *ZfL. Internationale Zeitschrift fuer Lebensmittel Technik, Marketing, Verpackung und Analytik. European Food Science*, *43*, 27-31.

[359] Hu, H., Fan, X., Zhou, Z., Xu, X., Fan, G., Wang, L., ... & Zhu, L. (2013). Acid-induced gelation behavior of soybean protein isolate with high intensity ultrasonic pre-treatments. *Ultrasonics sonochemistry*, *20*(1), 187-195.

[360] Grinberg, V. Y., Grinberg, N. V., Mashkevich, A. Y., Burova, T. V., & Tolstoguzov, V. B. (2002). Calorimetric study of interaction of ovalbumin with vanillin. *Food hydrocolloids*, *16*(4), 333-343.

[361] Donovan, J. W., Mapes, C. J., Davis, J. G., & Garibaldi, J. A. (1975). A differential scanning calorimetric study of the stability of egg white to heat denaturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *26*(1), 73-83.

[362] Kato, A., & Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-Protein structure*, *624*(1), 13-20.

[363] Haskard, C. A., & Li-Chan, E. C. (1998). Hydrophobicity of bovine serum albumin and ovalbumin determined using uncharged (PRODAN) and anionic (ANS-) fluorescent probes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(7), 2671-2677.

[364] Wang, X. S., Tang, C. H., Li, B. S., Yang, X. Q., Li, L., & Ma, C. Y. (2008). Effects of high-pressure treatment on some physicochemical and functional properties of soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 22(4), 560-567.

[365] Pallarès, I., Vendrell, J., Avilés, F. X., & Ventura, S. (2004). Amyloid fibril formation by a partially structured intermediate state of α -chymotrypsin. *Journal of molecular biology*, 342(1), 321-331.

[366] Yin, S. W., Tang, C. H., Wen, Q. B., & Yang, X. Q. (2010). Functional and conformational properties of phaseolin (*Phaseolus vulgaris* L.) and kidney bean protein isolate: A comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(4), 599-607.

[367] Wu, L., Zhao, W., Yang, R., & Chen, X. (2014). Effects of pulsed electric fields processing on stability of egg white proteins. *Journal of Food Engineering*, 139, 13-18.

[368] Li, K., Kang, Z. L., Zhao, Y. Y., Xu, X. L., & Zhou, G. H. (2014). Use of high-intensity ultrasound to improve functional properties of batter suspensions prepared from PSE-like chicken breast meat. *Food and bioprocess technology*, 7(12), 3466-3477.

[369] Tian, H., Xu, G., Yang, B., & Guo, G. (2011). Microstructure and mechanical properties of soy protein/agar blend films: Effect of composition and processing methods. *Journal of Food Engineering*, 107(1), 21-26.

[370] Zhang, Z., Arrighi, V., Campbell, L., Lonchamp, J., & Euston, S. R. (2016). Properties of partially denatured whey protein products: Formation and characterisation of structure. *Food Hydrocolloids*, 52, 95-105.

[371] Painter, P. C., & Koenig, J. L. (1976). Raman spectroscopic study of the proteins of egg white. *Biopolymers*, 15(11), 2155-2166.

[372] Li-Chan, E. C. Y. (1996). The applications of Raman spectroscopy in food science. *Trends in Food Science & Technology*, 7(11), 361-370.

[373] Hu, H., & Du, H. N. (2000). α -to- β structural transformation of ovalbumin: heat and pH effects. *Journal of Protein Chemistry*, 19(3), 177-183.

[374] Mine, Y., Noutomi, T., & Haga, N. (1990). Thermally induced changes in egg white proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 38(12), 2122-2125.

- [375] Zhang, P., Hu, T., Feng, S., Xu, Q., Zheng, T., Zhou, M., ... & Li-Chan, E. C. (2016). Effect of high intensity ultrasound on transglutaminase-catalyzed soy protein isolate cold set gel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 380-387.
- [376] Chi, Z., Chen, X. G., Holtz, J. S., & Asher, S. A. (1998). UV resonance Raman-selective amide vibrational enhancement: quantitative methodology for determining protein secondary structure. *Biochemistry*, 37(9), 2854-2864.
- [377] Nawrocka, A., Szymańska-Chargot, M., Miś, A., Ptaszyńska, A. A., Kowalski, R., Waśko, P., & Gruszecki, W. I. (2015). Influence of dietary fibre on gluten proteins structure—a study on model flour with application of FT-Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 46(3), 309-316.
- [378] Shin, S. Y., Calvisi, E. G., Beaman, T. C., Pankratz, H. S., Gerhardt, P., & Marquis, R. E. (1994). Microscopic and thermal characterization of hydrogen peroxide killing and lysis of spores and protection by transition metal ions, chelators, and antioxidants. *Applied and environmental microbiology*, 60(9), 3192-3197.
- [379] Dryáková, A., Pihlanto, A., Marnila, P., Čurda, L., & Korhonen, H. J. (2010). Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *European Food Research and Technology*, 230(6), 865-874.
- [380] Pan, M., Jiang, T. S., & Pan, J. L. (2011). Antioxidant activities of rapeseed protein hydrolysates. *Food and Bioprocess Technology*, 4(7), 1144-1152.
- [381] Ren, X., Ma, H., Mao, S., & Zhou, H. (2014). Effects of sweeping frequency ultrasound treatment on enzymatic preparations of ACE-inhibitory peptides from zein. *European Food Research and Technology*, 238(3), 435-442.
- [382] Opielinski, K. J. (2007). Ultrasonic parameters of hen's egg. *Molecular and Quantum Acoustics*, 28, 203-217.
- [383] Qu, W., Ma, H., Liu, B., He, R., Pan, Z., & Abano, E. E. (2013). Enzymolysis reaction kinetics and thermodynamics of defatted wheat germ protein with ultrasonic pretreatment. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(6), 1408-1413.
- [384] Han, I. H., Swanson, B. G., & Baik, B. K. (2007). Protein digestibility of selected legumes treated with ultrasound and high hydrostatic pressure during soaking. *Cereal chemistry*, 84(5), 518-521.

[385] Knežević-Jugović, Z. D., Stefanović, A. B., Žuža, M. G., Milovanović, S. L., Jakovetić, S. M., Manojlović, V. B., & Bugarski, B. M. (2012). Effects of sonication and high-pressure carbon dioxide processing on enzymatic hydrolysis of egg white proteins. *Acta Periodica Technologica*, (43), 33-41.

[386] Sharp, P. F., & Powell, C. K. (1931). Increase in the pH of the white and yolk of hens' eggs. *Industrial & Engineering Chemistry*, 23(2), 196-199.

[387] Kılıç Apar, D., & Özbek, B. (2007). Hydrolysis and solubilization of corn gluten by Neutrase. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 82(12), 1107-1114.

[388] González-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E., Paez, M. P., & Guadix, E. M. (1994). Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(4), 523-528.

[389] Yu, Z. L., Zeng, W. C., Zhang, W. H., Liao, X. P., & Shi, B. (2016). Effect of ultrasonic pretreatment on kinetics of gelatin hydrolysis by collagenase and its mechanism. *Ultrasonics sonochemistry*, 29, 495-501.

[390] Galvão, C. M., Pinto, G. A., Jesus, C. D., Giordano, R. C., & Giordano, R. L. (2009). Producing a phenylalanine-free pool of peptides after tailored enzymatic hydrolyses of cheese whey. *Journal of Food Engineering*, 91(1), 109-117.

[391] Abdulrahman, M. A. Y., Zhou, C., Zhang, Y., ElGasim Ahmed Yagoub, A., Ma, H., Mao, L., & Wang, K. (2017). Effects of ultrasound pretreatment on enzymolysis of sodium caseinate protein: Kinetic study, angiotensin-converting enzyme inhibitory activity, and the structural characteristics of the hydrolysates. *Journal of Food Processing and Preservation*.

[392] Rial-Otero, R., Carreira, R. J., Cordeiro, F. M., Moro, A. J., Santos, H. M., Vale, G., ... & Capelo, J. L. (2007). Ultrasonic assisted protein enzymatic digestion for fast protein identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: sonoreactor versus ultrasonic probe. *Journal of Chromatography A*, 1166(1), 101-107.

[393] Wang, B., Atungulu, G. G., Khir, R., Geng, J., Ma, H., Li, Y., & Wu, B. (2015). Ultrasonic treatment effect on enzymolysis kinetics and activities of ACE-inhibitory peptides from oat-isolated protein. *Food Biophysics*, 10(3), 244-252.

[394] Agyei, D., & Danquah, M. K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 29(3), 272-277.

[395] Sumantha, A., Larroche, C., & Pandey, A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 211.

[396] Miedzianka, J., Pęksa, A., Pokora, M., Rytel, E., Tajner-Czopek, A., & Kita, A. (2014). Improving the properties of fodder potato protein concentrate by enzymatic hydrolysis. *Food chemistry*, 159, 512-518.

[397] Waglay, A., & Karboune, S. (2016). Enzymatic generation of peptides from potato proteins by selected proteases and characterization of their structural properties. *Biotechnology progress*, 32(2), 420-429.

[398] Moorhouse, K. G., Nashabeh, W., Deveney, J., Bjork, N. S., Mulkerrin, M. G., & Ryskamp, T. (1997). Validation of an HPLC method for the analysis of the charge heterogeneity of the recombinant monoclonal antibody IDEC-C2B8 after papain digestion. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 16(4), 593-603.

[399] Sugiyama, K. E. K. I. C. H. I., Egawa, M. A. K. O. T. O., Onzuka, H. I. R. O. M. U., & Oba, K. (1991). Characteristics of sardine muscle hydrolysates prepared by various enzymic treatments. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*, 57, 475-479.

[400] Rebeca, B. D., Pena-Vera, M. T., & Diaz-Castaneda, M. (1991). Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; yield and nutritional value. *Journal of Food Science*, 56(2), 309-314.

[401] Liu, Y., Li, X., Chen, Z., Yu, J., Wang, F., & Wang, J. (2014). Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. *Food chemistry*, 151, 459-465.

[402] Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food chemistry*, 102(4), 1317-1327.

[403] Quaglia, G. B., & Orban, E. (1987). Enzymic solubilisation of proteins of sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 38(3), 263-269.

[404] Ballerini, G., Ortega, M., & Giordanengo, V. (2016). Effects of Enzymatic Hydrolysis on the Foaming Properties of Whey Proteins. *International Research Journal of Agricultural and Food Sciences* 1(4), 64-78.

[405] Mohanty, B., Mulvihill, D. M., & Fox, P. F. (1988). Emulsifying and foaming properties of acidic caseins and sodium caseinate. *Food Chemistry*, 28(1), 17-30.

[406] Poole, S. (1989). The foam-enhancing properties of basic biopolymers. *International Journal of Food Science & Technology*, 24(2), 121-137.

[407] Vanapalli, S. A., Palanuwech, J., & Coupland, J. N. (2002). Stability of emulsions to dispersed phase crystallization: effect of oil type, dispersed phase volume fraction, and cooling rate. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 204(1), 227-237.

[408] Dickinson, E., & Galazka, V. B. (1991). Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of β -lactoglobulin with polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 5(3), 281-296.

[409] Betancur-Ancona, D., Martínez-Rosado, R., Corona-Cruz, A., Castellanos-Ruelas, A., Jaramillo-Flores, M. E., & Chel-Guerrero, L. (2009). Functional properties of hydrolysates from *Phaseolus lunatus* seeds. *International journal of food science & technology*, 44(1), 128-137.

[410] Zheng, X. Q., Wang, J. T., Liu, X. L., Sun, Y., Zheng, Y. J., Wang, X. J., & Liu, Y. (2015). Effect of hydrolysis time on the physicochemical and functional properties of corn glutelin by Protamex hydrolysis. *Food chemistry*, 172, 407-415.

[411] Zhao, G., Liu, Y., Zhao, M., Ren, J., & Yang, B. (2011). Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate. *Food Chemistry*, 127(4), 1438-1443.

[412] Surówka, K., Żmudziński, D., & Surówka, J. (2004). Enzymic modification of extruded soy protein concentrates as a method of obtaining new functional food components. *Trends in Food Science & Technology*, 15(3), 153-160.

[413] Ghribi, A. M., Gafsi, I. M., Sila, A., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., ... & Besbes, S. (2015). Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. *Food chemistry*, 187, 322-330.

[414] do Evangelho, J. A., Vanier, N. L., Pinto, V. Z., De Berrios, J. J., Dias, A. R. G., & da Rosa Zavareze, E. (2017). Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. *Food chemistry*, 214, 460-467.

[415] Adamson, N. J., & Reynolds, E. C. (1996). Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: Determination of enzyme specificity. *Enzyme and microbial technology*, 19(3), 202-207.

[416] Calderon de la Barca, A. M., Ruiz-Salazar, R. A., & Jara-Marini, M. E. (2000). Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. *Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology*, 65, 246–253.

[417] Henning, T., Mothes, R., Dudek, S., Krause, J. P., & Schwenke, K. D. (1997). Structural and functional changes of faba bean legumin during super-limited tryptic hydrolysis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 41(2), 81-86.

[418] Qi, M., Hettiarachchy, N. S., & Kalapathy, U. (1997). Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. *Journal of Food Science*, 62(6), 1110-1115.

[419] Jung, S., Murphy, P. A., & Johnson, L. A. (2005). Physicochemical and functional properties of soy protein substrates modified by low levels of protease hydrolysis. *Journal of Food Science*, 70(2), 180–187.

[420] Ortiz, S. E. M., & Wagner, J. R. (2002). Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food research international*, 35(6), 511-518.

[421] Celus, I., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2007). Enzymatic hydrolysis of brewers' spent grain proteins and technofunctional properties of the resulting hydrolysates. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(21), 8703-8710.

[422] Fabian, H., Schultz, C., Backmann, J., Hahn, U., Saenger, W., Mantsch, H. H., & Naumann, D. (1994). Impact of point mutations on the structure and thermal stability of

ribonuclease T1 in aqueous solution probed by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 33(35), 10725-10730.

[423] Reinstädler, D., Fabian, H., & Naumann, D. (1999). New structural insights into the refolding of ribonuclease T1 as seen by time-resolved Fourier-transform infrared spectroscopy. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 34(3), 303-316.

[424] Fabian, H., Schultz, C., Naumann, D., Landt, O., Hahn, U., & Saenger, W. (1993). Secondary structure and temperature-induced unfolding and refolding of ribonuclease T1 in aqueous solution: A Fourier transform infrared spectroscopic study. *Journal of molecular biology*, 232(3), 967-981.

[425] Fabian, H., & Mäntele, W. (2002). Infrared spectroscopy of proteins. *Handbook of vibrational spectroscopy*. John Wiley & Sons Ltd.

[426] Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(9), 1073-1101.

[427] Adochitei, A., & Drochioiu, G. (2011). Rapid characterization of peptide secondary structure by FT-IR spectroscopy. *Revue Roumaine de Chimie*, 56(8), 783-791.

[428] Jin, J., Ma, H., Wang, K., Yagoub, A. E. G. A., Owusu, J., Qu, W., ... & Ye, X. (2015). Effects of multi-frequency power ultrasound on the enzymolysis and structural characteristics of corn gluten meal. *Ultrasonics sonochemistry*, 24, 55-64.

[429] Bari, A. H., & Pandit, A. B. (2014). Ultrasound-facilitated particle breakage: Estimation of kinetic parameters using population balance modelling. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 92(12), 2046-2052.

[430] Stathopoulos, P. B., Scholz, G. A., Hwang, Y. M., Rumfeldt, J. A., Lepock, J. R., & Meiering, E. M. (2004). Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid. *Protein Science*, 13(11), 3017-3027.

[431] Wang, Z., Lin, X., Li, P., Zhang, J., Wang, S., & Ma, H. (2012). Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment. *Bioresource technology*, 117, 222-227.

[432] Saluja, V., Amorij, J. P., Kapteyn, J. C., de Boer, A. H., Frijlink, H. W., & Hinrichs, W. L. J. (2010). A comparison between spray drying and spray freeze drying to produce an influenza subunit vaccine powder for inhalation. *Journal of Controlled Release*, 144(2), 127-133.

[433] Wang, B., Tchessalov, S., Warne, N. W., & Pikal, M. J. (2009). Impact of sucrose level on storage stability of proteins in freeze-dried solids: I. correlation of protein–sugar interaction with native structure preservation. *Journal of pharmaceutical sciences*, 98(9), 3131-3144.

[434] Osorio, J., Monjes, J., Pinto, M., Ramírez, C., Simpson, R., & Vega, O. (2014). Effects of spray drying conditions and the addition of surfactants on the foaming properties of a whey protein concentrate. *LWT-Food Science and Technology*, 58(1), 109-115.

[435] Filkova, I., Huang, L. X., & Mujumdar, A. S. (2007). *Industrial spray drying systems*. In A. S. Mujumdar (Ed.), *Handbook of industrial drying (3rd ed.)*. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis.

[436] Masters, K. (1985). *Spray drying handbook* (4th ed.). New York, Wiley.

[437] Obón, J. M., Castellar, M. R., Alacid, M., & Fernández-López, J. A. (2009). Production of a red–purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 471-479.

[438] Cuartas, B., Alcaina, M. I., & Soriano, E. (2004). Separation of mineral salts and lactose solutions through nanofiltration membranes. *Food science and technology international*, 10(4), 255-262.

[439] Lechevalier, V., Jeantet, R., Arhaliass, A., Legrand, J., & Nau, F. (2007). Egg white drying: Influence of industrial processing steps on protein structure and functionalities. *Journal of Food Engineering*, 83(3), 404-413.

[440] Tang, S., Hettiarachchy, N. S., Horax, R., & Eswaranandam, S. (2003). Physicochemical Properties and Functionality of Rice Bran Protein Hydrolyzate Prepared from Heat-stabilized Defatted Rice Bran with the Aid of Enzymes. *Journal of food science*, 68(1), 152-157.

[441] Linares, E., Larré, C., & Popineau, Y. (2001). Freeze-or spray-dried gluten hydrolysates. 1. Biochemical and emulsifying properties as a function of drying process. *Journal of Food Engineering*, 48(2), 127-135.

[442] Raghavendra, S. N., Swamy, S. R., Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Kumar, S., & Tharanathan, R. N. (2006). Grinding characteristics and hydration properties of coconut residue: A source of dietary fiber. *Journal of Food Engineering*, 72(3), 281-286.

[443] Fisher, G. (2009). *Carrageenan effect on the water retention and texture in processes turkey breast* (Doctoral dissertation). Rutgers The State University of New Jersey-New Brunswick).

[444] Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Martín-Sánchez, A., Sánchez-Zapata, E., Fernández-López, J., Sendra, E., ... & Pérez-Álvarez, J. A. (2012). Chemical, physico-chemical and functional properties of pomegranate (*Punica granatum L.*) bagasses powder co-product. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 220-224.

[445] Lan, G., Chen, H., Chen, S., & Tian, J. (2012). Chemical composition and physicochemical properties of dietary fiber from *Polygonatum odoratum* as affected by different processing methods. *Food Research International*, 49(1), 406-410.

[446] Bueno-Solano, C., López-Cervantes, J., Campas-Baypoli, O. N., Lauterio-García, R., Adan-Bante, N. P., & Sánchez-Machado, D. I. (2009). Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food chemistry*, 112(3), 671-675.

[447] USDA. (2010). USDA national nutrient database for standard reference, preuzeto sa <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>.

[448] Zamora, R., & Hidalgo, F. J. (2005). Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the nonenzymatic food browning. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(1), 49-59.

[449] Stewart, G. F., & Kline, R. W. (1948). Factors influencing rate of deterioration in dried egg albumen. *Industrial & Engineering Chemistry*, 40(5), 916-919.

[450] Stapelfeldt, H., Nielsen, B. R., & Skibsted, L. H. (1997). Effect of heat treatment, water activity and storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder. *International Dairy Journal*, 7(5), 331-339.

[451] Wu, Z., Yue, L., Li, Z., Li, J., Mujumdar, A. S., & Rehkopf, J. A. (2015). Pulse combustion spray drying of egg white: energy efficiency and product quality. *Food and bioprocess technology*, 8(1), 148-157.

[452] Saha, B. C., & Hayashi, K. (2001). Debittering of protein hydrolyzates. *Biotechnology Advances*, 19(5), 355-370.

[453] Lin, S. B., Nelles, L. P., Cordle, C. T., & Thomas, R. L. (1997). Physical factors related to C18 adsorption columns for debittering protein hydrolysates. *Journal of food science*, 62(5), 946-1010.

[454] Cheison, S. C., Wang, Z., & Xu, S. Y. (2007). Use of macroporous adsorption resin for simultaneous desalting and debittering of whey protein hydrolysates. *International journal of food science & technology*, 42(10), 1228-1239.

[455] Gong, M., Mohan, A., Gibson, A., & Udenigwe, C. C. (2015). Mechanisms of plastein formation, and prospective food and nutraceutical applications of the peptide aggregates. *Biotechnology Reports*, 5, 63-69.

[456] FitzGerald, R. J., & O'cuinn, G. (2006). Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. *Biotechnology Advances*, 24(2), 234-237.

Prilog 1.**Izjava o autorstvu**

Potpisani-a: Andrea Stefanović

broj indeksa: 4009/2011

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

**OPTIMIZACIJA ENZIMSKIH POSTUPAKA ZA DOBIJANJE HIDROLIZATA
PROTEINA BELANCETA KAO KOMPONENATA FUNKCIONALNE HRANE
PRIMENOM TEHNOLOGIJE ULTRAZVUKA VISOKOG INTENZITETA**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 21. 4. 2017.

Andrea Stefanović

Prilog 2.**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada**

Ime i prezime autora: Andrea Stefanović

Broj indeksa: 4009/2011

Studijski program: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

Naslov rada: **Optimizacija enzimskih postupaka za dobijanje hidrolizata proteina belanceta kao komponenata funkcionalne hrane primenom tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta**

Mentor: Dr Zorica Knežević-Jugović, vanredni profesor

Potpisani/a: 

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 21. 4. 2017.



Prilog 3.**Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku "Svetozar Marković" da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**OPTIMIZACIJA ENZIMSKIH POSTUPAKA ZA DOBIJANJE HIDROLIZATA
PROTEINA BELANCETA KAO KOMPONENATA FUNKCIONALNE HRANE
PRIMENOM TEHNOLOGIJE ULTRAZVUKA VISOKOG INTENZITETA**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 21. 4. 2017.

Andrea Stefanović