

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

Јелена Р. Јовановић

**ПРОИЗВОДЊА БИОЛОШКИ  
АКТИВНИХ ПЕПТИДА ПРОТЕИНА  
БЕЛАНЦЕТА ЕНЗИМСКИМ  
ПОСТУПКОМ, ИЗОЛОВАЊЕ И  
КАРАКТЕРИЗАЦИЈА**

докторска дисертација

Београд, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Jelena R. Jovanović

**PRODUCTION OF BIOLOGICALLY  
ACTIVE PEPTIDES DERIVED FROM  
EGG WHITE PROTEINS BY ENZYMATIC  
PROCESS, ISOLATION AND  
CHARACTERIZATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

**Ментор:**

---

**Др Зорица Кнежевић-Југовић**, редовни професор,  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

**Чланови комисије:**

---

**Др Бранко Бугарски**, редовни професор,  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

---

**Др Радивоје Продановић**, редовни професор,  
Универзитет у Београду, Хемијски факултет

---

**Др Маја Вукашиновић-Секулић**, ванредни професор,  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

---

**Др Соња Јоковетић Танасковић**, научни сарадник,  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

**Датум одбране:** \_\_\_\_\_

\*\*\*\*\*

Резултати ове докторске дисертације део су истраживања предложених у пројекту интегралних и интердисциплинарних истраживања под називом „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонента хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“ (ИППИ 46010), који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије у периоду од 2011. до 2018. године. Велики део истраживања остварен је кроз међународни Еурека пројекат Е16750 између Републике Србије и Републике Словеније под називом „Развој ензимских процеса за производњу хидролизата протеина из беланцета“ у периоду од 2012. до 2014. године, као и кроз национални иновациони пројекат под називом „Производња нових дијететских формулација на бази природних протеина са антиоксидативним и антитуморским дејством“ (Биотехнологија, храна и пољопривреда, у периоду од 2014. до 2015. године).

\*\*\*\*\*

Експериментални рад ове докторске дисертације изведен је у лабораторијама на Катедри за Биохемијско инжењерство и биотехнологију и Катедри за Хемијско инжењерство Технолошко-металушког факултета Универзитета у Београду. Важан део експеримената урађен је у лабораторији за експерименталну хематологију и матичне ћелије на Институту за Медицинска истраживања Универзитета у Београду, као и на Катедри за Биохемију Хемијског факултета Универзитета у Београду.

\*\*\*\*\*

*„Ништа човека не чини толико срећним као његово поштено уверење да је учинио све што је могао, улажући у свој рад своје најбоље способности.“*

*Михајло Пупин*

## **ЗАХВАЛНИЦА**

\*\*\*\*\*

Неизмерну захвалност дугујем свом ментору, **проф. др Зорици Кнежевих-Југовић**, ред. проф. Технолошко-металуришког факултета, на подршци и поверењу које ми је указала, на стрпљивом и пажљивом усмеравању, на несебичном улагању знања и искуства, на великој помоћи, труду и сугестијама током израде ове дисертације, што је за мене од непроцењивог значаја.

Посебну захвалност желим да искажем **проф. др Бранку Бугарском**, ред. проф. Технолошко-металуришког факултета, **проф. др Радивоју Продановићу**, ред. проф. Хемијског факултета и **проф. др Маји Вукашиновић-Секулић**, ван. проф. Технолошко-металуришког факултета на издвојеном времену, ангажовању, дискусијама и корисним сугестијама који су допринели квалитетнијем истраживању и обликовању ове докторске дисертације.

Велико хвала дугујем **др Соњи Јаковетић Танасковић**, научном сараднику Технолошко-металуришког факултета, на срдочној сарадњи и сугестијама које су на најлепши начин допринеле квалитету ове докторске дисертације.

**Било је задовољство сарађивати са свима!**

\*\*\*\*\*

Свим пријатељима и колегама са Катедре за Биохемијско инжењерство и биотехнологију Технолошко-металуришког факултета, као и са Катедре за Биохемију Хемијског факултета, желим да се захвалим на безусловној помоћи и подршци у току израде ове дисертације. Драгој **Андреи Стефановић** и драгој **Наташи Шекуљици** неизмерно хвала на дружењу и помоћи, стрпљењу и охрабривању у важним моментима реализације ове дисертације. Такође, велико хвала **др Сањи Грбавчић** која је увек била ту када је било потребно. Бескрајно хвала **др Диани Бугарској** и **др Ивани Окић Ђорђевић** на отворености за сарадњу, логистици, пренесеним знањима, као и извођењу експеримената у лабораторији за експерименталну хематологију и матичне ћелије на Институту за Медицинска истраживања Универзитета у Београду.

**Најлепше Вам хвала!**

\*\*\*\*\*

Захваљујем се Министарству просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије који су стипендирани мој рад на докторској дисертацији у периоду од 2012-2015. године.

\*\*\*\*\*

*Мојим дивним пријатељима неизмерно хвала на искреној љубави, подршци и искреном пријатељству током свих ових година.*

\*\*\*\*\*

*Од свег срца захваљујем се мом Стефану на неизрецивој љубави, разумевању, вери у добро, подршци и позитивној енергији.*

\*\*\*\*\*

*И на крају, посебно и највеће хвала дугујем својој породици, брату Слободану, мами Снежани и тати Ранку, чији је сваки откуцај срца био испуњен бескрајном вером, безусловном љубављу, подршком и охрабривању на путу ка остварењу овог циља. Њима у част, од срца, посвећена је ова докторска дисертација.*

*Најлепше вам хвала!*

\*\*\*\*\*

## Производња биолошки активних пептида протеина беланцета ензимским поступком, изоловање и карактеризација

### РЕЗИМЕ

Предмет научног истраживања докторске дисертације јесте развој ензимског поступка производње биолошки активних пептида ултразвучно третираних нативних протеина беланцета, њихово изоловање и карактеризација.

У првом делу истраживања извршена је оптимизације ензимског поступка хидролизе протеина беланцета у шаржном реакторном систему са аспекта испитивања утицаја рН вредности, интензитета и параметара ултразвучног претретмана на ток ензимске хидролизе и остварен степен хидролизе, са највећим освртом на укупну антиоксидативну активност добијених хидролизата. Констатовано је да повећање рН вредности протеина беланцета позитивно утиче на брзину ензимске реакције хидролизе, њен даљи ток, као и на способност неутралисања DPPH<sup>•</sup> радикала. Највећи степен неутралисања DPPH<sup>•</sup> радикала уочен је код хидролизата беланцета рН 8,6 ( $34,6 \pm 1,44\%$ ). Почетна брзина ензимске реакције и степен хидролизе значајно су варирали у зависности од дужине трајања и интензитета ултразвучног претретмана, а ултразвучни претретман изведен сондом ( $20 \pm 0,2$  kHz) у дужини трајања 15 минута, при мањој фреквенци и знатно вишем интензитету, довео је до веће конформационе покретљивост молекула протеина беланцета и већој доступности ензиму у поређењу са ултразвучним купатилом ( $40 \pm 2$  kHz). Сагледавањем вредности остварених брзина ензимске реакције, степена хидролизе и антиоксидативне активности, једностепенна хидролиза беланцета у шаржном реактору са мешањем катализована протеазом из *Bacillus licheniformis* (алкалаза), и двостепенна ензимска хидролиза катализована алкалазом и флеворизмом (протеаза из *Aspergillus oryzae*), издвојиле су се као најефикасније. У кинетичкој студији, утврђено смањење инхибиције ензима супстратом, као и повећање активности ензима и брзине реакције, указали су на побољшање ензимске хидролизе протеина беланцета након ултразвучног претретмана. Ултразвучни третман допринео је повећању брзине ензимске реакције, узрокујући и повећање укупне површинске хидрофобности, садржаја реактивних SH група и повећање вредности ζ-потенцијала. Упоредо са повећањем садржаја SH група забележено је смањење средње величине и промена расподеле величине агрегата протеина беланцета.

Други део истраживања посвећен је разумевању између дужине и секвенце пептида добијених из протеина беланцета и биолошке функције. Најпре је одређена корелација између степена хидролизе и антиоксидативне активности, како би се нутритивно вредни хидролизати тачно дефинисаног састава полипептидних ланаца могли успешно одвојити на биолошки најактивније фракције. Највеће антиоксидативне активности (>75%) оставарене су при степенима хидролизе ~ 28%, чиме је утврђено да је управо при овом степену хидролизе постигнут посебан састав ослобођених полипептида и олигопептида. Извршено је ултрафилтрационо раздвајање хидролизата, припремљених са степеном хидролизе до 28%, на мембранама различитих величина пора (30, 10, 30 и 1 kDa) и утврђено је да је масени удео изолованих пептида у опсегу маса 1-3 и 3-10 kDa добијених ултразвучним третманом два пута већи од удела изолованих пептида са термичким третманом. Изоловане фракције пептида сакупљене су и извршена је њихова карактеризација са аспекта различитих биолошких својстава, али је проучен и синергизам биолошких активности чиме је дат значајан допринос разумевању механизма деловања биоактивних пептида, као и проналажењу корелације између дужине и секвенце пептида и њихове биолошке функције.

Изоловане фракције пептида окарактерисане су одређивањем антиоксидативне активности при чему је утврђено да зависно од степена биорасположивости, врсте и састава, пептиди протеина беланцета могу понудити одређени ниво заштите ћелијама против токсичних ефеката реактивних кисеоничних врста и јона прелазних метала, при чему се фракције молекулских маса 3-10 и 1-3 kDa, издвају као оне са највишим нивоима инхибиције слободних радикала (преко 70% при концентрацији пептида 1-1,2 mg/cm<sup>3</sup>). Ове фракције поседују изузетне способности супресије слободних радикалских група као што су ABTS<sup>•+</sup> радикалски катјон, хидроксил радикал и супероксид анјон радикал, али и липидне пероксидације и степена хелирања Fe<sup>2+</sup> јона. Хидролизати протеина беланцета и изоловане пептидне фракције додати у липидну емулзију β-каротен-линолна киселина испољили су изузетну способност да инхибирају формирање пероксил радикала током 120 минута инкубације у поређењу са контролним узорком нативног нетретираниог беланцета.

Даљом карактеризацијом утврђено је да антипролиферативни ефекат фракција пептида молекуле масе 3-10 kDa зависи од типа туморске ћелијске линије, примењене концентрације пептида и времена инкубације. Као најизражајнији ефекат



на ћелијске линије аденокарцинома дојке (MCF-7) и колоректалног аденокарцинома (SW480) издвојио се управо онај који су испољили узорци изолованих ултрафилтрационих фракција пептида, у којима су нативни протеини беланцета непосредно пре ензимске хидролизе били подвргнути ултразвуку фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz. Нарочито је изражена инхибиција пролиферације при концентрацијама узорака пептида од  $35,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  и инкубацији од 72 сата. У испитивањима цитотоксичног ефекта на пролиферацију мезенхималних матичних ћелија изолованих из перодонталног лигамента у одабраном распону концентрација и времена инкубације, утврђено је да фракција пептида молекулске масе 3-10 kDa не испољава инхибиторни ефекат, што је од изузетне важности за формулисање функционално активних пептида/протеина садржаних у финалном дијететском производу. Писоновом корелационом анализом успостављена је позитивна корелација ( $p < 0,05$ ) између антиоксидативне и антипролиферативне активности чиме је утврђено да порастом антиоксидативне активности са аспекта неутрализације ABTS<sup>+</sup> радикаског катјона линеарно расте антипролиферативна активност, у случају обе туморске ћелијске линије.

Испитивањем антимикробних својстава утврђено је да пептиди беланцета не поседују инхибиторну активност према ћелијама квасца *Candida albicans*, али да испољавају антибактеријску активност, нарочито према патогеној Грам-позитивној *Staphylococcus aureus* за коју је познато да узрокује тровање храном, као последица конзумирања хране која је загађена ентеротоксинима. Резултати испитивања антихипертензивне активности показали су да изоловани пептиди јако инхибирају активност ангиотензин-конвертујућег ензима. Међу резултатима, са аспекта генерисаних ултразвучних таласа различите фреквенце није забележена статистички значајна разлика ( $p > 0,05$ ) у вредностима степена инхибиторне активности, али је приликом одређивања IC<sub>50</sub> забележена и те како значајна разлика ( $p < 0,05$ ). IC<sub>50</sub> вредности износиле су  $67,85 \pm 1,29$  и  $76,68 \pm 1,31 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  за ултразвучни претретман фреквенце  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz, редом. Мерењем времена коагулације рекалцификоване плазме, антикоагулативна активност пептида беланцета била је знатно нижа ( $p < 0,05$ ) од аспирина који се користи у антикоагулантној терапији.

Последњи део докторске дисертације био је посвећен пречишћавању биолошки најактивније фракције пептида (3-10 kDa) применом препаративне течне хроматографије на гел-филтрационој колони и карактеризацији са аспекта

антиоксидативне активности. Том приликом утврђена је способност неутрализације ABTS<sup>•+</sup> радикаског катјона у изолованим фракцијама, али је такође утврђена разлика у расподели величине пептида и њихових секвенци код узорак третираних ултразвуком фреквенце  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz. На основу резултата степена хидрофобности површине молекула пептида у изолованим фракцијама и антиоксидативне активности, потврђено је да највећу хидрофобност поседују управо фракције са најизраженијим биолошким активностима, фракција-3 (3-10 kDa) и фракција-4 (1-3 kDa). Резултатима из овог дела потврђена је и успостављена релација између молекулских маса и понаособ једне од биолошких активности. Са циљем добијања биолошки најактивније фракције пептида у већем приносу, на самом крају истраживања, извршена је производња биоактивних пептида у мембранском реактору са рецикулацијом са акцентом на оптимизацију начина извођења процеса и избором конфигурације реакторског система. Резултати кинетичких параметара у шаржном и мембранском систему, као и резултати антиоксидативне активности добијених фракција пептида међусобно су упоређени. Том приликом утврђена је висока продуктивност и принос пептида са антиоксидативном активношћу, тако да се континуална производња фракција пептида беланцета показала као ваoma ефикасна.

Свеобухватно, резултатима ове докторске дисертације утврђено је постојање синергистичког ефеката две или више биолошких активности пептида беланцета што у досадашњим истраживањима није довољно испитано, као и релације између молекулске масе пептида и једне од биолошких активности. Резултати имају изузетан практичан значај и могу послужити као основа за формулисање биолошки активних фракција пептида садржаних у финалној формулацији производа који уједно представљају део нових технолошких поступака производње.

**Кључне речи:** протеини беланцета, ултразвук високог интензитета, ензимска хидролиза, биолошки активни пептиди, антипролиферативна активност, антиоксидативна активност, антимикробна активност, мембранско раздвајање, континуални мембрански реактор

**Научна област:** Технолошко инжењерство

**Ужа научна област:** Биохемијско инжењерство и биотехнологија

**UDK број:**

## **Production of biologically active peptides derived from egg white proteins by enzymatic process, isolation and characterization**

### **SUMMARY**

The scope of this doctoral research is the development of new enzymatic processes for the production of biologically active peptides from ultrasound pretreated egg white proteins, their isolation and characterization.

In the first part of the research, the optimization of the enzymatic hydrolysis of egg white protein in the batch reactor was performed. Namely, the influence of pH of the native egg white proteins as well as the intensity and parameters of the ultrasonic pretreatment on the course of enzymatic hydrolysis and the achieved degree of hydrolysis was determined, with the greatest emphasis on the total antioxidant potential of the obtained protein hydrolysates. It was noted that the increase in pH of egg white protein positively influences the rate of enzymatic hydrolysis reaction, the further course of the hydrolysis and DPPH<sup>•</sup> radical scavenging activity. The highest scavenging activity was observed for the hydrolysate of egg white with pH 8.6 ( $34.6 \pm 1.44\%$ ). The initial rate of reaction and the degree of hydrolysis varied significantly depending on the duration time and intensity of ultrasound pretreatment, and the ultrasound pretreatment performed by a probe ( $20 \pm 0.2$  kHz) for 15 min, at a lower frequency and significantly higher intensity compared to an ultrasound bath ( $40 \pm 2$  kHz) led to a higher conformation change in the interior of molecules and greater susceptibility to the enzyme. By reviewing the values of the achieved reaction rate constants, the degree of hydrolysis and antioxidant activity, the one-step hydrolysis of the egg white protein in the batch reactor catalyzed by the protease from *Bacillus licheniformis* (alcalase), and two-step enzymatic hydrolysis catalyzed with a combination of alcalase and flavourzyme (proteases from *Aspergillus oryzae*), have been distinguished as the most effective. In the kinetic study, a reduction of enzyme inhibition by substrate, as well as an increase in enzyme activity and reaction rate, have indicated an improvement in enzymatic hydrolysis of ultrasound pretreated egg white proteins. The ultrasound pretreatment contributed to an increase in the reaction rate, causing an increase in surface hydrophobicity, the content of reactive SH groups, and an increase in the value of  $\zeta$ -potential. Parallel with the increasing content of SH groups, a reduction in mean particle size of aggregates of the protein and modified particle size distribution were observed.

The aim of the second part of the research was to correlate the molecular weight (length) and sequence of egg white-derived peptides and several biological functions. Firstly, the correlation between the degree of hydrolysis and the antioxidant activity is determined, so that the nutritionally valuable hydrolysates with a precisely defined composition of polypeptide chains can be successfully separated into the bioactive peptide fractions. The highest scavenging activity (> 75%) was achieved at the degree of hydrolysis ~ 28%, revealing that a special composition of released polypeptides and oligopeptides was achieved at this degree of hydrolysis. Based on the molecular weight distribution, the ultrafiltration separation of hydrolysates prepared with a hydrolysis degree around 28% was performed with membranes of different cut-off (30, 10, 30 and 1 kDa). It was found that the yields of peptides with the molecular weight in the range of 1-3 and 3-10 kDa obtained by ultrasound treatment was twice higher compared with heat treatment. The isolated peptide fractions were collected and their characterization was made from the aspect of various bioactive properties, but the synergy of biological activities was also studied, contributing significantly to the understanding of the mechanism of bioactive peptide action, as well as finding the correlation of the peptide length and sequence and their bioactivities.

The isolated peptide fractions were characterized by determining the antioxidant activity, and it was found that, depending on the degree of bioavailability, type and composition, egg white-derived peptides may offer a certain level of protection of the cells against the toxic effects of reactive oxygen species and transition metal ions. The fractions of peptides with molecular weight in the range of 3- 10 and 1-3 kDa appeared to present the highest levels of free radical scavenging (over 70% at a peptide concentration of 1-1.2 mg/cm<sup>3</sup>). These peptide fractions have possessed exceptional suppression capabilities of free radical groups such as ABTS<sup>•+</sup> radical cation, hydroxyl radical and superoxide anion radical, but also lipid peroxidation and Fe<sup>2+</sup> ions. Protein hydrolysates and isolated peptide fractions, added to the lipid emulsion of  $\beta$ -carotene-linoleic acid, have exhibited exceptional ability to inhibit the formation of peroxy radicals during 120 minutes of incubation compared to the control sample of the native untreated egg white protein.

Further characterization revealed that the antiproliferative effect of peptide fractions with molecular weight of 3-10 kDa depended on the type of tumor cell line, peptide concentration, and incubation time. It seemed that the isolated ultrafiltration peptide fractions derived from egg white native proteins which were subjected to an ultrasound

treatment at frequency  $20\pm 0.2$  kHz just before enzymatic hydrolysis, exhibited the most expressive effect on both, breast adenocarcinoma lines (MCF-7) and colorectal adenocarcinoma (SW480). The inhibition of both cell proliferation, at concentrations of the peptide samples of  $35.0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  and a 72-hour incubation, were particularly pronounced. During the examination of the cytotoxic effects on the proliferation of mesenchymal stem cells isolated from the periodontal ligament, it has been found that the peptide fractions with molecular weight 3-10 kDa did not exhibit an inhibitory effect in the selected range of incubation concentrations and times, which is of utmost importance for designing the final functional active peptides/proteins formulation. Pearson's correlation analysis established a positive correlation ( $p < 0.05$ ) between the antioxidant and antiproliferative activities, and it was found that the antiproliferative activity linearly increased with an increase of ABTS<sup>•+</sup> radical cation scavenging activity, in the case of both tumor cell lines.

By investigating antimicrobial properties, it has been found that egg white-derived peptides did not possess inhibitory activity against the yeast cells *Candida albicans*, but they exhibited the antibacterial activity, especially against the pathogenic Gram-positive *Staphylococcus aureus*, known to cause food poisoning as a result of consuming foods contaminated with enterotoxins. The results of the antihypertensive activity have shown that isolated peptides strongly inhibited the activity of the angiotensin-converting enzyme. No statistically significant difference ( $p > 0.05$ ) between the results in the value of antihypertensive activity, was recorded in terms of ultrasound generated by different frequency, but the significant difference ( $p < 0.05$ ) was noted concerning  $\text{IC}_{50}$  values. The  $\text{IC}_{50}$  values were  $67.85\pm 1.29$  and  $76.68\pm 1.31 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  for the ultrasound pretreatment at frequency  $20\pm 0.2$  and  $40\pm 2$  kHz, respectively. By measuring the time of coagulation recalcification plasma, the anticoagulant activity of egg white-derived peptides was significantly lower ( $p < 0.05$ ) than the aspirin, which is conventionally used in anticoagulant therapy.

The final part of the research was focused on the purification of the ultrafiltration peptide fraction (3-10 kDa) with the highest bioactivity using preparative liquid size-exclusion chromatography and also characterization in terms of antioxidant activity. On this occasion, the ability of new isolated peptide fractions to scavenge ABTS<sup>•+</sup> radical was determined, but also the difference in the peptide size distribution and their sequences were established for the samples treated with ultrasound waves at frequency of  $20\pm 0.2$  and  $40\pm 2$  kHz. Based on the results of the surface hydrophobicity degree of the peptide in isolated

fractions and antioxidant activity, it was confirmed that both fraction-3 (3-10 kDa) and fraction-4 (1-3 kDa) had the most pronounced biological activities. The results from this section confirmed and established the relationship between the molecular weight of peptide fractions and separately one of the biological activities. In order to obtain the biologically active peptide fraction in a high yield, the production of bioactive peptides in the membrane reactor with recirculation was performed, especially with emphasis on optimization of hydrolysis process, design and configuration of the reactor system. The results of the kinetic parameters in the batch and membrane reactor systems, as well as the results of the antioxidant activity of the obtained peptide fractions, were mutually compared. In this case, a rather high productivity and yield of peptides with antioxidant activity were achieved in the membrane reactor system, so that continuous production of egg white-derived peptide fractions proved to be very effective.

Summary, the results obtained from this doctoral dissertation seemed to contribute in explaining the synergistic effect of two or more biological activities of the egg white-derived peptides, as well as the interactions between some individual peptides and one of the biological activities, which in the previous research has not been sufficiently analyzed. The results are extremely practical and can serve as the basis for designing the bioactive egg white-derived peptides contained in the final product formulation, which are also part of the new technological production processes.

**Key words:** egg white proteins, high-intensity ultrasound, enzymatic hydrolysis, biologically active peptides, antiproliferative activity, antioxidant activity, antimicrobial activity, membrane separation, continuous membrane reactor

**Research field:** Technological Engineering

**Specilaized research filed:** Biochemical Engineering and Biotechnology

**UDK number:**

## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ПРОТЕИНИ БЕЛАНЦЕТА</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1. ОСНОВНИ ПРОТЕИНИ БЕЛАНЦЕТА</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2. МАЊЕ ЗАСТУПЉЕНИ ПРОТЕИНИ БЕЛАНЦЕТА</b> .....	<b>11</b>
<b>3. БИОЛОШКИ АКТИВНИ ПЕПТИДИ</b> .....	<b>14</b>
3.1. СТРУКТУРА И ФУНКЦИЈА БИОЛОШКИ АКТИВНИХ ПЕПТИДА .....	15
3.2. БИОЛОШКИ АКТИВНИ ПРОТЕИНИ/ПЕПТИДИ БЕЛАНЦЕТА.....	29
<b>4. ЕНЗИМСКА ХИДРОЛИЗА ПРОТЕИНА</b> .....	<b>36</b>
4.1. ТЕОРИЈСКЕ ОСНОВЕ ЕНЗИМСКЕ ХИДРОЛИЗЕ ПРОТЕИНА.....	36
4.1.1. <i>Једностепенa и двоcтeпeнa eнзимcкa хидрoлизa прoтeинa бeлaнцeтa</i> .....	39
4.2. ПРОТЕОЛИТИЧКИ ЕНЗИМИ .....	41
4.2.1. <i>Комерцијалнe прoтeазe зa хидрoлизу прoтeинa бeлaнцeтa</i> .....	44
4.2.2. <i>Примeнa прoтeолитичкиx eнзимa сa аспeктa унaпрeђeњa биoлoшких својстaвa прoтeинa и/или пeптидa</i> .....	47
4.3. КИНЕТИКА ЕНЗИМСКЕ ХИДРОЛИЗЕ ПРОТЕИНА .....	50
4.3.1. <i>Емпирijски кинeтички мoдeл хидрoлизe прoтeинa бeлaнцeтa</i> .....	51
4.4. УЛТРАЗВУЧНИ ПРЕТРЕТМАН ПРОТЕИНА .....	54
4.4.1. <i>Мехaнизaм дeлoвaњa ултразвучних тaлaсa</i> .....	55
4.4.2. <i>Примeнa ултразвукa у прoизвoдњи и дeтeкцији биoактивних пeптидa</i> .....	58
<b>5. ИЗОЛОВАЊЕ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПЕПТИДА ПРОТЕИНА БЕЛАНЦЕТА ПРИМЕНОМ РАЗЛИЧИТИХ СЕПАРАЦИОНИХ ТЕХНИКА</b> .....	<b>63</b>
5.1. СЕПАРАЦИЈА ПРОТЕИНСКИХ ХИДРОЛИЗАТА ПРИМЕНОМ УЛТРАФИЛТРАЦИОНИХ И ХРОМАТОГРАФСКИХ ТЕХНИКА .....	63
5.2. МЕМБРАНСКЕ ТЕХНОЛОГИЈЕ ЗА РАЗВОЈ ЕНЗИМСКИХ МЕМБРАНСКИХ РЕАКТОРА .....	71
<b>6. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ</b> .....	<b>76</b>
6.1. МАТЕРИЈАЛИ .....	76
6.2. ИНСТРУМЕНТИ .....	79
6.3. МЕТОДЕ .....	81
6.3.1. <i>Припрeмa прoтeинa бeлaнцeтa зa eнзимcкy хидрoлизy</i> .....	81
6.3.2. <i>Прeтeрeтмaн прoтeинa бeлaнцeтa ултразвучним тaлaсимa висoкoг интeнзитeтa</i> .....	81
6.3.3. <i>Одрeђивaњe снагe и интeнзитeтa ултразвукa</i> .....	82
6.3.4. <i>Ензимcкa хидрoлизa прoтeинa бeлaнцeтa у шaржнoм рeкaтoру сa мeхaничким мeшaњeм</i> .83	
6.3.5. <i>Прaћeњe тoкa eнзимcкe хидрoлизe прoтeинa бeлaнцeтa</i> .....	86
6.3.5.1. <i>Одрeђивaњe стeпeнa хидрoлизe рН-стaт мeтoдoм</i> .....	86

6.3.5.2. Одређивање степена хидролизе нинхидринском методом .....	87
6.3.5.3. Одређивање степена хидролизе методом са TNBS киселином .....	89
6.3.6. Ензимска хидролиза протеина беланцета у континуалном реакторском систему повезаним са мембранском сепарационом јединицом.....	90
6.3.7. Кинетика хидролизе протеина беланцета у шаржном реактору са механичким мешањем .	92
6.3.8. Лорџева (Lorju) метода за одређивање садржаја протеина .....	93
6.3.9. Дијализа хидролизата протеина беланцета .....	94
6.3.10. Одређивање степена хидрофобности површине молекула протеина беланцета и њихове агрегације.....	95
6.3.10.1. Мерење средње величине честица и зета потенцијала .....	96
6.3.10.2. Садржај укупних и реактивних сулфхидрилних група .....	97
6.3.10.3. Мерење површинске хидрофобности .....	99
6.3.11. Расдела молекулских маса протеинских хидролизата беланцета применом трицин-SDS-PAGE електрофорезе.....	100
6.3.12. Ультрафилтрационо фракционисање хидролизата нативних протеина беланцета .....	104
6.3.13. <i>In vitro</i> методе за мерење антиоксидативне активности хидролизата и/или пептидних фракција .....	106
6.3.13.1. Одређивање антиоксидативне активности методом редукције DPPH• радикала .....	106
6.3.13.2. Одређивање редукујуће моћи.....	107
6.3.13.3. Одређивање антиоксидативне активности методом редукције ABTS радикала .....	107
6.3.13.4. Одређивање способности неутрализације хидроксил радикала.....	109
6.3.13.5. Одређивање способности неутрализације супероксид радикала .....	111
6.3.13.6. Одређивање способности хелирања металних јона.....	112
6.3.13.7. Одређивање способности инхибиције липидне пероксидације .....	114
6.3.13.8. Одређивање способности инхибиције оксидативне деградације β-каротена ... ..	115
6.3.14. Мерење антипролиферативне активности хидролизата и/или пептидних фракција <i>in vitro</i> методом.....	117
6.3.15. Мерење антимикуробне активности хидролизата и/или пептидних фракција .....	118
6.3.16. Мерење антихипертензивне активности хидролизата и/или пептидних фракција.....	120
6.3.17. Мерење антикоагулативне активности хидролизата и/или пептидних фракција .....	122
6.3.18. Хроматографске технике пречишћавања и квантитативног карактерисања хидролизата и/или фракција пептида .....	123



6.3.18.1. Реверзно-фазна течна хроматографија под високим притиском (RP-HPLC)...	123
6.3.18.2. Гел-филтрациона хроматографија.....	123
6.3.19. Статистичка анализа експерименталних резултата.....	125
<b>7. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>126</b>
7.1. ЕНЗИМСКА ХИДРОЛИЗА ПРОТЕИНА БЕЛАНЦЕТА У ШАРЖНОМ РЕАКТОРУ СА МЕХАНИЧКИМ МЕШАЊЕМ.....	126
7.1.1. Утицај рН вредности протеина беланцета на ензимску хидролизу.....	127
7.1.2. Утицај интензитета и параметара ултразвучног претретмана на ензимску хидролизу протеина беланцета.....	130
7.1.3. Оптимизација ензимске хидролизе протеина беланцета применом различитих врста протеолитичких ензима у једноступеном и двоступеном ензимском поступку.....	133
7.1.3.1. рН-стат метода наспрам техника без одржавања константне рН у ензимској хидролизи протеина беланцета.....	140
7.2. КИНЕТИЧКА СТУДИЈА ЕНЗИМСКЕ ХИДРОЛИЗЕ ПРОТЕИНА БЕЛАНЦЕТА..	144
7.2.1. Утицај процесних параметара на кинетику једноступеног поступка хидролизе протеина беланцета.....	144
7.2.1.1. Утицај ултразвучног претретмана на вредности кинетичких параметара и кинетичких константи.....	150
7.2.1.2. Утицај ултразвучног претретмана на термодинамичку анализу ензимске хидролизе протеина беланцета.....	154
7.2.1.3. Утицај ултразвучног претретмана на површинске карактеристике агрегата протеина беланцета.....	160
7.2.2. Утицај процесних параметара на кинетику двоступеног поступка ензимске хидролизе протеина беланцета.....	169
7.3. УЛТРАФИЛТРАЦИОНО ФРАКЦИОНИСАЊЕ ХИДРОЛИЗАТА НАТИВНИХ ПРОТЕИНА БЕЛАНЦЕТА.....	176
7.3.1. Утицај ултразвучног третмана на удео ултрафилтрационих фракција пептида.....	181
7.4. АНТИОКСИДАТИВНА АКТИВНОСТ ИЗЛОВЕНИХ ФРАКЦИЈА ПЕПТИДА ИЗ НАТИВНИХ ПРОТЕИНА БЕЛАНЦЕТА.....	186
7.4.1. Утицај састава и величине пептида на способност инхибиције реактивних кисеоничних врста и слободних радикала.....	187
7.4.2. Утицај састава и величине пептида на способност инхибиције липидне пероксидације.....	197
7.4.3. Утицај састава и величине пептида на способност желирања металних јона.....	204
7.5. АНТИПРОЛИФЕРАТИВНА АКТИВНОСТ ИЗЛОВЕНИХ ФРАКЦИЈА ПЕПТИДА ИЗ НАТИВНИХ ПРОТЕИНА БЕЛАНЦЕТА.....	210

7.5.1. Утицај састава и величине пептида на способност инхибирања пролиферације туморских хелијских линија.....	211
7.5.2. Утицај састава и величине пептида на пролиферацију мезенхималних матичних хелија изолованих из перидонталног лигамента .....	219
7.5.3. Корелација између антиоксидативне и антипролиферативне активности .....	222
7.6. АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ ИЗЛОВЕНИХ ФРАКЦИЈА ПЕПТИДА ИЗ НАТИВНИХ ПРОТЕИНА БЕЛАНЦЕТА.....	227
7.7. АНТИХИПЕРТЕНЗИТИВНА И АНТИКОАГУЛАТИВНА АКТИВНОСТ ИЗЛОВЕНИХ ФРАКЦИЈА ПЕПТИДА ИЗ НАТИВНИХ ПРОТЕИНА БЕЛАНЦЕТА.....	237
7.7.1. Корелација између антиоксидативне и антихипертензивне активности.....	243
7.7.2. Утицај састава и величине пептида на антикоагулативну активност изолованих фракција пептида.....	246
7.8. ПРЕЧИШЋАВАЊЕ ИЗЛОВЕНИХ ФРАКЦИЈА ПЕПТИДА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА .....	251
7.9. ПРОИЗВОДЊА БИОАКТИВНИХ ПЕПТИДА У МЕМБРАНСКОМ РЕАКТОРУ СА РЕЦИРКУЛАЦИЈОМ И ЊИХОВА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА .....	260
<b>8. ЗАКЉУЧАК .....</b>	<b>273</b>
<b>9. РЕФЕРЕНЦЕ.....</b>	<b>279</b>

## 1. УВОД

Биоактивни пептиди су због своје мале молекулске масе и лаке апсорпције нашли велику примену као имунорегулатори, антихипертензивни и антимикробни пептиди, али и као антиоксиданти.<sup>1</sup> Поред породичне склоности ка обољењу од одређене врсте карцинома, најчешћи узрок болести су оксидативни стрес и неправилна, нездрава исхрана. Вишак слободних радикала доводи до одвијања различитих оксидативних реакција, које пак могу проузроковати оштећења ћелија и/или њихових делова. Као такав, оксидативни стрес и слободни радикали сматрају се иницијаторима и/или пропагаторима болести попут кардиоваскуларних, упалних процеса, канцера и дијабетеса. Зато је успоравање оксидативних процеса у ћелијама услед узимања различитих дијететских суплемената или у храни услед додатака различитих природних и синтетских антиоксиданата од посебног значаја. Тачан механизам антиоксидативне и других активности пептида још увек није у потпуности разјашњен, али многобројне студије показују да су они инхибитори липидне пероксидације, инхибитори тзв. „хватачи“ слободних радикала и хелатори прелазних метала.<sup>2-3</sup> Генерално њихова антиоксидативна, антимикробна и антихипертензивна својства повезују се једино са њиховим аминокиселинским саставом, који у великој мери одређује њихову структуру и степен хидрофобности.<sup>4</sup> Тако на пример, пептиди који у својој секвенци садрже аминокиселинске остатке Тур, Трп, Мет, Лус, Сус, и Нис показују антиоксидативну активност, будући да имају ароматични остатак који може да донира протоне радикалима, док се антиоксидативна активност пептида који садржи Нис огледа у донирању атома водоника, инхибицији пероксил радикала и способности хелирања јона метала. SH група цистеина има кључну улогу у антиоксидативној активности услед директне интеракције са радикалима. Међутим, поред аминокиселинског састава, велики утицај на биолошка својства има и њихова секвенца, тако да је за нпр. антиоксидативну активност неких пептида кључно присуство His-His сегмента на C-терминалном крају, док пептиди са врло снажном инхибиторном активношћу ангиотензин-конвертујућег ензима (ACE-активност) поседују аминокиселине Pro, Phe или Тур на C-терминалном крају, а на N-терминалном крају Val и Ile.<sup>1,4-5</sup>

Присуство и правилан положај базних и/или киселих, ароматичних и хидрофобних аминокиселинских остатака у оквиру пептидне секвенце које доводе до

побољшања биолошких активности пептида могу се постићи парцијалном и контролисаном ензимском хидролизом нативних протеина. Њоме се ослобађају специфични биоактивни ди-, три- и олигопептиди, те се добијени хидролизати могу користити као нови биоактивни суплементи. Накнадно, из њих се применом различитих сепарационих техника могу изоловати и пречистити пептиди специфичне пептидне секвенце, али и извршити карактеризација са аспекта различитих биоактивних својстава.<sup>6</sup> Иако нативни протеини и/или њихови хидролизати поседују значајан број биолошких активности попут антиоксидативне, антихипертензивне, антикоагулативне, антипролиферативне,<sup>4</sup> још увек није изолован и идентификован довољан број биоактивних пептида који настају хидролизом одабраних нативних протеина, а поседују истовремено две или више биолошке активности.

Због свог јединственог аминокиселинског састава и изузетних функционалних својстава, протеини беланцета представљају важан индустријски производ са аспекта извора нутритивно и биолошки вредних протеина, али је њихова шира комерцијална употреба у виду протеинских додатака исхрани ограничена због велике вискозности, алергености, недовољне дигестивности и термолабилности.<sup>7-8</sup> Увидом у доступну литературу, научна истраживања се најчешће заснивају на ензимској хидролизи модел протеина беланцета, овалбумина, овотрансферина и лизозима, као и на изоловању и карактеризацији биоактивних пептида управо из ових протеинских фракција и/или њихових хидролизата.<sup>9-11</sup> Међутим, нема много радова у којима се као полазни супстрат за изоловање биолошки активних пептида користи нативно беланце.

Главни проблем имплементације биолошки активних пептида јесу њихова нестабилност и промена хемијске структуре услед термичке обраде, која последично доводи до промене биолошке активности. Конкретно, претретман протеина беланцета на високим температурама испољава негативне пропратне ефекте који се огледају у одвијању сложене Милардове и других реакција, које доводе до тамњења производа и настајања једињења са токсичним, мутагеним и тератогеним ефектима. Поред тога, приликом термичког поступка у благо алкалној средини долази до неселективне и неконтролисане хидролизе протеина беланцета, њихове иреверзибилне денатурације, тако да се значајно смањује и нутритивна вредност производа.<sup>12-13</sup> Зато, процес производње нестабилних биоактивних пептида из

високо нутритивних протеина, као што је беланце, захтева коришћење иновативних неинвазивних технологија (нпр. ултразвук високог интензитета) које омогућавају задржавање биолошке активности без образовања нежељених споредних производа и ефеката.<sup>14</sup>

Утицај ултразвука на ензимску хидролизу протеина беланцета, као и на профил и биолошку активност пептида није довољно истражен, али се истиче да технологија ултразвука као брза, поуздана и ефикасна техника може потпомоћи ензимску хидролизу, као и ослобађање биолошки активних пептида. Током извођења третмана ултразвучним таласима неопходно је водити рачуна о врсти и конструкцији уређаја за генерисање таласа, као и дужини трајања самог третмана, али је исто тако потребно и задовољити и захтеве који се односе на очување функционалних, реолошких и нутритивних својстава добијених хидролизата и/или фракција пептида и унапређење биолошких активности. Сувише интензиван третман ултразвуком довести до интермолекулских интеракција након развијања молекула протеина, а последично до њиховог агрегирања, повећања честица и промене физичких и реолошких својстава. Због тога, од изузетне важности, је успостављање корелације између интензитета и параметара ултразвучног третмана (време третирања, амплитуда, фреквенца), ензимске хидролизе и биолошких својстава добијених пептида.<sup>14-16</sup> Наведени захтеви не представљају једноставан задатак и захтевају испитивање великог броја оперативних параметара и протеолитичких ензима са ендо- и егзо-пептидазним механизмом деловања.

Свеобухватно, производња пептида протеина беланцета, како у облику смеше хидролизата тако и у облику фракција пептида, може послужити као основа за формулисање биолошки активних пептида беланцета садржаних у финалној формулацији производа који уједно представљају део нових технолошких поступака производње дијететски суплемената функционалне хране, фармацеутика и/или нутрацеутика.

*ТЕОРИЈСКИ ДЕО*

---

## 2. ПРОТЕИНИ БЕЛАНЦЕТА

Беланце (албумен) као високонутритивни извор протеина постао је важан предмет научних интересовања протеклих деценија. Најпре је било претпостављено да се беланце састоји само од једног протеина, али су научна истраживања са аспекта коагулације, преципитације и фракционисања довела до сазнања да се састоји од више протеинских фракција различитих физичко-хемијских својстава. Доказано је да састав беланцета чине три основна протеина: 1) албумин кристалне структуре назван **овалбумин**, 2) албумин некристалне структуре назван **коналбумин** и 3) неколагулациони протеин назван **овомукоид**.<sup>17-18</sup> Око 63% укупне масе јајета чини беланце, физичке стуктуре сличне гелу која је последица присуства овомуцина. Стуктуру беланцета карактеришу два слоја: 1) **спољашњи гушћи и дебљи слој** и 2) **унутрашњи ређи и тањи слој**.<sup>19</sup>

Значај и примену беланцета готово је немогуће занемарити због одличних функционалних карактеристика (способност пењења, гелирања и емулговања) и садржаја висококвалитетних и храњивих протеина. Протеини беланцета имају ниску цену, нетоксични су, а за лизозим је потврђено да потпомаже стабилизацију ензима и испољава антибактеријску активност.<sup>19</sup> Поред тога, беланце се успешно користи за коимобилизацију ензима, каталазе и инвертазе, и за имобилизацију ћелија.<sup>20-22</sup> Примена протеина беланцета као протеинских суплемената ограничена је услед алергености, нестабилности, промене структуре под утицајем фактора животне средине и недовољно изражене биолошке активности. Са аспекта садржаја есенцијалних аминокиселина протеини беланцета се издвајају као протеини са најуравнотеженијим и најквалитетнијим саставом, при чему је нарочито висок садржај аминокиселина са сумпором. Због наведеног, користи се за поређење приликом утврђивања храњиве вредности других протеина хране.<sup>19</sup>

### 2.1. ОСНОВНИ ПРОТЕИНИ БЕЛАНЦЕТА

Основне компоненте беланцета чине **вода** (87,91%) и **протеини** (9,7-12% по маси беланцета; просечно 10,52%).<sup>7</sup> Остатак су **угљени хидрати**, **липиди**, **пепео** у траговима и **микронутријенти**, **витамини** (аскорбинска киселина, тиамин, рибофлавин, никотинска киселина, пантотенска киселина и пиридоксал) и **минерали** (Са, Fe, Mg, P, K, Na и Zn). Висок садржај калијума и натријума у

беланцету превасходно је важан за мембрански потенцијал који има главну улогу у контракцији мишића, преносу нервних импулса, правилном раду срца, преносу нутријената и метаболита кроз ћелију.<sup>23</sup>

Протеини беланцета припадају глобуларним протеинима. Пет основних протеина су: **овалбумин, коналбумин (овотрансферин), овомукоид, овомуцин и лизозим**. Остали мање заступљени протеини су: **овоглобулини, авидин, овоинхибитор, цистатин, овогликопротеин, овомакроглобулин и овофлавопротеин** (Табела 2.1).

Табела 2.1. Протеини беланцета и њихова физичко-хемијска својства.<sup>7, 24</sup>

Основни протеини	Масени удео (%)	pI	Молекулска маса (kDa)	T <sub>d</sub> (°C)
Овалбумин	54,0	4,5	45	71,5-84
Овотрансферин	12,0	6,1 - 6,6	76-80	57,3
Овомукоид	11,0	3,9 - 4,3	28	77
Овомуцин	3,5	4,5 - 5,0	110	/
Лизозим	3,4	10,7	14,3-14,6	81,5
Мање заступљени протеини	Масени удео (%)	pI	Молекулска маса (kDa)	T <sub>d</sub> (°C)
Овоглобулини	8,0	5,5-5,8	30-49	92,5
Овофлавопротеин	0,8	4,0 - 4,1	32-35	69-72
Овомакроглобулин	0,5	4,5 - 4,7	760-900	69-72
Овоинхибитор	1,5	5,1 - 5,2	44-49	69-72
Цистатин	0,05	5,1	12	/
Овогликопротеин	1,0	3,9	24-24,4	69-72
Авидин	0,05	9,5 - 10,0	55- 68,3	/

Легенда: pI - изоелектрична тачка протеина; T<sub>d</sub> - температура денатурације.

## **ОВАЛБУМИН**

Најзаступљенији, а уједно и основни протеин значајан за функционална својства беланцета је овалбумин, чији је укупан масени удео око 54%. Овалбумин има молекулску масу 44,5 kDa и по хемијској структури је мономерни фосфогликопротеин чији је аминокиселински састав у потпуности познат – састоји се од 385 остатака аминокиселина, од којих чак половина има хидрофобни карактер. Овалбумин има шест остатака цистеина од којих су два укључена у формирање дисулфидне везе, тако да укупно поседује четири слободне сулфхидрилне групе. Пречишћен молекул



састоји се од три компоненте: A1, A2 и A3, које садрже две, једну и ниједну фосфатну групу по молекулу, редом.<sup>25</sup> N-терминални крајеви овалбумина су ацетиловани и садрже четири сулфхидрилне групе и један сулфидни мост (Cis74-Cis121) који су недоступни у нативном облику. Секундарна структура овалбумина укључује  $\alpha$ -хеликс (41%),  $\beta$ -равни (34%),  $\beta$ -завојнице (12%) и насумичне намотаје (13%).<sup>26</sup> На Слици 2.1а приказана је 3D структура овалбумина, са које је евидентно да овалбумин има веома уређену структуру и лако се уочавају реактивни  $\alpha$ -хеликс, који излази из основе протеина и главне  $\beta$ -равни. Реакциони центар смештен је у секвенци Ala358-Ser359.<sup>27</sup>

У беланцету јајета пронађен је S-овалбумин, форма протеина која доприноси хетерогености овалбумина и који се карактерише већом топлотном стабилношћу, познат као „стабилан“ овалбумин. Присуство S-овалбумина утврђено је и на основу температуре денатурације (92,5 °C) која је виша у поређењу са температуром денатурације овалбумина (84,5 °C). Анализирањем кристалне структуре S-овалбумина потврђено је да не постоје значајне разлике у односу на секундарну структуру овалбумина. Незнатне промене у секундарној структури уочене су између L- и D-изомера код остатака Ser у положајима 164, 236 и 320 и делу  $\beta$ -равни између остатака у положајима 125-128. Наведене разлике утичу на смањење доступности језгра протеина околном растварачу што узрокује повећање стабилности протеина.<sup>27</sup> Остале физичко-хемијске карактеристике S-овалбумина не разликују се у поређењу са овалбумином, али је Рамановом спектроскопијом уочена компактнија структура S-овалбумина, као последица термостабилности<sup>25</sup> и повећаног степена површинске хидрофобности.<sup>28</sup> Механизам превођења овалбумина у S-овалбумин није утврђен, али се претпоставља да је последица деамидације или парцијалног увођења реактивних завојница.<sup>27</sup> Складиштењем садржај S-овалбумина у беланцету се повећава толико да од почетне вредности која у свежем јајету износи 5% након шест месеци чувања, на температури 2 °C, износи 81%.<sup>28</sup>

### **ОВОТРАНСФЕРИН**

Други најзаступљенији протеин у беланцету је овотрансферин са масеним уделом од 12%. По хемијској структури је гликопротеин, молекулске масе 77,7 kDa и pI око 6,1, а састоји се од 686 аминокиселинских остатака. Садржи једноструки ланац глукана на C-терминалном домену који се састоји од манозе и N-ацетилглюкозаминских остатака. Има 15 дисулфидних мостова, од којих је шест

лоцирано на *N*-домену, а осталих девет на *C*-домену. Спада у термолабилне протеине беланцета и на температури од 60 °C се денатурише.<sup>7,24</sup> Овотрансферин се везује за јоне гвожђа стварајући стабилне комплексе, тако да припада групи гликопротеина који везујући јоне гвожђа образују структуру хема, познату као трансферини. С обзиром да је активност везивања гвожђа изузетно велика сматра се да је управо ова карактеристика овотрансферина одговорна за његова антимикробна својства. За један молекул овотрансферина могу се везати по два јона  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{CO}_3^{2-}$ , што доводи до стабиловања и повећања температуре денатурације са 60 °C на око 72 °C. Комплекс који овотрансферин формира са јонима гвожђа отпоран је на протеолитичку хидролизу. Интензитет боје комплекса зависи од присуства кисеоника који реагује са протеином,  $\text{Fe}^{3+}$  јонима и карбонатима. У одсуству кисеоника ствара се жуто обојени комплекс који додатком аскорбата прелази у лосос-розе боју.<sup>28-29</sup>

На основу кристалне 3D структуре (Слика 2.1б), утврђено је да се овотрансферин састоји од два хомолога домена тзв. режња (*N*-домен и *C*-домен), и да сваки од тих делова има по две области. Места на којима се протеин везује за јоне гвожђа локализована су и обухватају Asp63, Tyr95, Tyr188, His249 и Asp392, Tyr426, Tyr517, His585 у *N*- и *C*-доменима, редом.<sup>30</sup> Потврђено је да апо-форма овотрансферина (без јона  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ) има изоелектричну тачку 6,73, док холо-форма (са  $\text{Fe}^{3+}$ ) има вредност изоелектричне тачке 5,78. Основна улога овог протеина у организму јесте транспорт јона гвожђа до ћелија. Ослобађање јона гвожђа из молекула трансферина захтева присуство анјона, као што су пирофосфати, сулфати и хлориди. Комплекс овотрансферина са јоном гвожђа стабилнији је у односу на апо-форму у погледу протеолитичке хидролизе и термичке денатурације. У киселој средини *C*-терминални домен овотрансферина показује мању везујућу стабилност и већу способност ослобађања јона гвожђа у односу на *N*-терминални домен.<sup>31-32</sup> Овотрансферин поседује велики број биолошких активности, о којима ће бити више речи у наредном поглављу.

### **ОВОМУКОИД**

По хемијској структури, овомукоид је гликопротеин молекулске масе 28 kDa са *pI* око 4,1 и познат је као инхибитор трипсина. Угљени хидрати чине ~ 25% овог гликопротеина, а за њега се везују преко апсарагинске киселине. Овомукоид не садржи слободне сулфхидрилне групе, али је потврђено постојање девет

дисулфидних мостова.<sup>7, 28</sup> Због великог броја дисулфидних мостова овомукоид је веома стабилан молекул и његове физичко-хемијске карактеристике се не мењају ни при дужем временском излагању киселој средини и температури од 100 °C.<sup>28</sup> Дисулфидни мостови имају значајну улогу у тешкој сварљивости овог протеина. При екстремном термичком третману може доћи до губитка трипсин инхибиторне активности услед редукције и алкиловања дисулфидних мостова.<sup>30, 33</sup>

Структуру овомукоида чине три домена (Слика 2.1г), међусобно повезана дисулфидним везама, због чега је веома резистентан на високе температуре и протеазе. Укупан број аминокиселинских остатака је 185. Домени овомукоида су у потпуности хомологни инхибитору трипсина секретованог из панкреаса. Место означено као реактивно за функцију трипсин инхибитора налази се у другом домену овомукоида на секвенцама Arg89-Ala90. Домени I и II имају у својој структури N-терминални угљенохидратни ланац, док домен III нема. Ови угљенохидратни ланци садрже тетра- и пента- комплексе који се састоје од манозе, галактозе и N-глукозамина. Одређивањем секундарне структуре утврђено је присуство: 26%  $\alpha$ -хеликса, 46%  $\beta$ -набораног листа, 10%  $\beta$ -завојнице и 18% насумичних намотаја.<sup>30</sup> Алергијске реакције овомукоид изазива присутан и у веома малим количинама. Ни термички третман ни ензимска хидролиза овог протеина не могу смањити његов алергени капацитет. Наведено својство, чини овај протеин одличним маркером за испитивање присуства беланцета у прехранбеним производима.<sup>33</sup>

### **ОВОМУЦИН**

Овомуцин је вискозни гликопротеин чији је удео у беланцету 1,5-3,5%, са рI у опсегу 4-5,5, а одговоран је за гелирајућа својства беланцета.<sup>7</sup> Нерастворан је у води, осим у присуству соли или при рН>9.<sup>30</sup> Састоји се од  $\alpha$ -субјединице која садржи 10-15% угљених хидрата ( $\alpha$ -овомуцин) и  $\beta$ -субјединице која обилије угљеним хидратима, односно садржи 50-65% угљених хидрата ( $\beta$ -овомуцин). У зависности од молског удела  $\alpha$ - и  $\beta$ -овомуцина може се образовати густо нерастворно беланце и ретко растворљиво беланце. Однос  $\alpha$ - и  $\beta$ -овомуцина у нерастворном или густом беланцету износи  $\alpha:\beta = 84:20$ , док код раствороног или ретког овомуцина тај однос је 40:3. У састав ланца угљених хидрата улази 15-18,6% хексозе, 7-12% хексамина и 2,5-8% сијалинске киселине.<sup>7</sup> Методом скенирајуће микроскопије утврђено је да  $\beta$ -овомуцин испољава цитотоксични ефекат на раст туморских ћелија.<sup>34</sup>

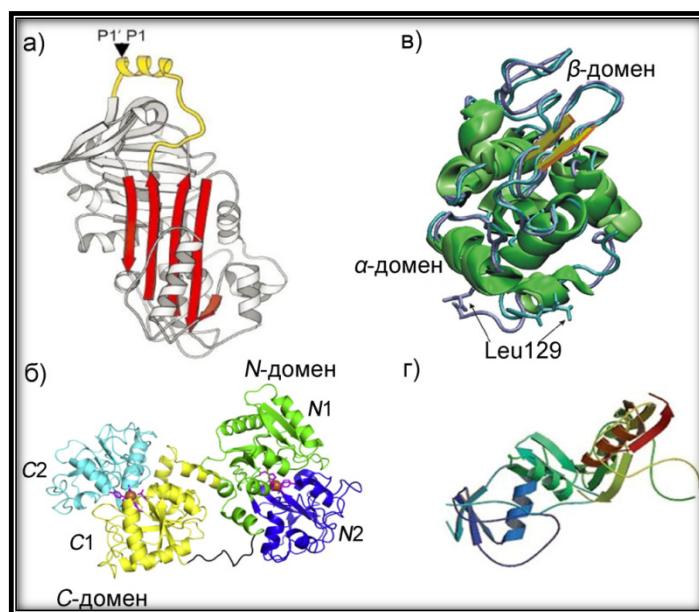
Знатан део хемијског састава овомуцина чине хидроксилне групе естерификоване сумпорном киселином. Због свог поларног карактера, овомуцин образује филаментозну и фибрилну структуру. Истраживање су показала да овомуцин инхибира хемаглутамације изазване вирусима. Важан је за одређивање квалитета јајета. Отпоран је на термички третман и доприноси желатинастој структури беланцета. Наиме, велика вискозност беланцета последица је великог садржаја овомуцина у њему. Одоговоран је и за физичко-хемијска својства беланцета, као што су пењење и емулгациона способност. Захваљујући својим дугим протеинским ланцима умреженим са олигосахаридним јединицама утиче на стабилност пене. Главни разлог његових добрих емулгационих својстава су хидрофобност и флексибилност, као и интеракције овог протеина са осталим протеинима беланцета.<sup>28, 35</sup> Доказано је да овомуцин и изоловани пептиди, добијени ензимском хидролизом овомуцина, поседују биоактивна својства, као и могућност инхибиције апсорпције холестерола због чега је употреба овомуцина као функционалне хране у све већем порасту.<sup>36-37</sup>

### **ЛИЗОЗИМ**

Један од највише проучаваних протеина беланцета коме је прво одређена секвенца је лизозим. Лизозим је мали протеин који се састоји од свега 129 аминокиселинских остатака, молекулске масе 14,7 kDa и вредности изоелектричне тачке, pI 10,7. Чини око 3,5% укупних протеина беланцета, од којих се најчешће везује за овомуцин, овалбумин и/или оворотрансферин. Одређивањем 3D структуре утврђено је се молекул лизозима састоји од четири дисулфидна моста, нема слободних сулфхидрилних група, и да структуру чине два домена повезана  $\alpha$ -хеликсом. Структуру *N*-терминалног домена углавном сачињава анти-паралелни  $\beta$ -наборани лист и неколико  $\alpha$ -хеликса, док структуру другог домена чине  $\alpha$ -хеликси (Слика 2.1в).<sup>38</sup>

У природи лизозим налази се у облику мономера, али може да гради и реверзибилне димере. Димери лизозима показују најразличитија биолошки активна својства (нпр. терапеутска, антивирусна, антипролиферативна и антиинфламаторна својства) о којима ће детаљније бити речи у наредном поглављу. Употреба лизозима у фармацеутској индустрији огледа се у спречавању бактеријских, вирусних и инфламаторних инфекција, али је и незаобилазни састојак многих терапеутских крема против опекотина и вирусних инфекција коже. Применом лизозима у

технологији производње сира и пива остварују се значајна технолошка својства, као нпр. контролисање раста млечних бактерија током ферментације. Најважнија употреба лизозима јесте као антимикуробног агенса у прехранбеној индустрији, услед термичке стабилности, активности у широком температурном опсегу 1-100 °С, стабилности током замрзавања, оптималне рН у опсегу 5,3-6,4, као и способности да редукује стабилност образовањем дисулфидних веза.<sup>38</sup> Међутим, редуковањем броја дисулфидних веза у лизозиму, нарушавају се функционална својства беланцета као нпр. пењење и гелирање.<sup>25</sup>



**Слика 2.1.** Кристална структура (а) овалбумина,<sup>27</sup> (б) овоотрансферина,<sup>31</sup> (в) лизозима<sup>39</sup> и (г) овомукоида.<sup>40</sup>

## 2.2. МАЋЕ ЗАСТУПАЊЕНИ ПРОТЕИНИ БЕЛАНЦЕТА

**Авидин** је тетрамерни, позитивно наелектрисан гликопротеин чије су субјединице идентичног аминокиселинског састава и секвенце аминокиселина. Састоји се од 128 аминокиселинских остатака и мале је молекулске масе 15,6 kDa (Слика 2.2а). Откривен је скоро у исто време кад и биотин (витамин Б12). Нековалентним везивањем са четири молекула биотина формира стабилан комплекс, који као такав не може да се апсорбује у цревном систему животиња. Иреверзибилно се денатурише на температури од 70 °С, док је комплекс са биотином (авидин-биотин) стабилан на 100 °С. Како би се раскинула веза између биотина и авидина, неопходно је загревање на 120 °С у трајању од 15 минута. Са биохемијског аспекта

ове јаке интеракције авидина са биотином, као и интеракције њихових коњугата, су изузетно пожељне тако да су готово незаобилазне у многим биохемијским и биотехнолошким процесима. Конкретно, користе се у бројним лабораторијским техникама укључујући: ELISA тестове, хистохемију и цитохемију, молекуларно препознавање и обележавање, пречишћавање афинитетном хроматографијом, технике раздвајања ћелија на основу њихових особина (*на енгл.* fluorescence-activated cell sorting, FACS). Открићем авидина и његове биолошке функције уведен је термин антивитамина, због авидин-биотин комплекса, с обзиром да је биотин везан за авидин и да је његово искришћавање иако је присутно у организму онемогућено. Ипак, авидин се успешно инаktivира загревањем, па је конзумирања јаја класичним поступком припреме у домаћинству не представља проблем.<sup>41</sup>

**Овоглобулин** у беланцету присутан је у два различита облика. Најпре, откривено је присуство три глобулина, G1, G2 и G3, али је касније G1 идентификован и карактерисан као лизозим. Заједно, овоглобулин G2 и G3 чине ~ 0,4% протеина присутних у беланцету, а анализом аминокиселинског и угљенохидратног састава (3,2-3,7% хексоза, 2,4-2,5% хексозамина) потврђено је да су G2 и G3 глобулини слични један другом. Молекулске масе G2 и G3 глобулини износе 30 и 49 kDa, са изоелектричним тачкама, pI 5,5 и 5,8, редом. Пречишћавањем на јоноизмењивачкој колони и електрофрентским раздвајањем, утврђено је да G3 овоглобулин испољава већу резистентност термичкој денатурацији (92,5 °C) у поређењу са G2 овоглобулин. Функционална и биолошка својства овоглобулина још увек нису детаљно истражена, али се са сигурношћу зна да G2 и G3 глобулини омогућавају образовање пене беланцета.<sup>7,19</sup>

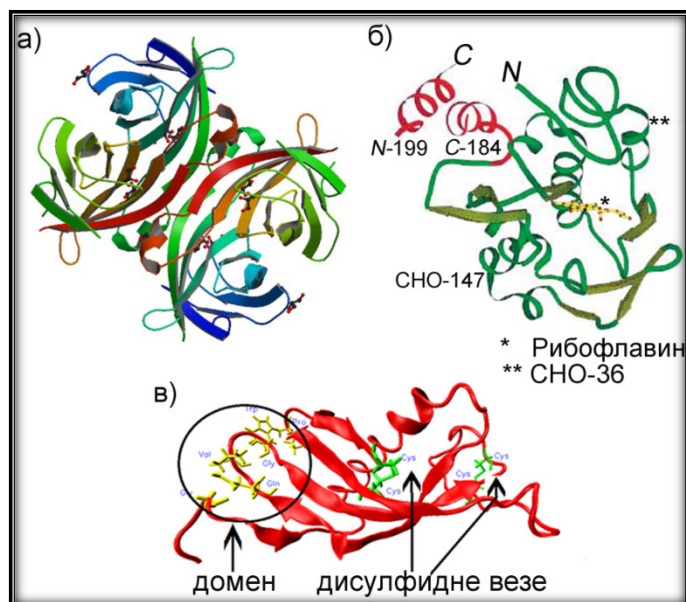
**Овоинхибитор**, молекулске масе 50 kDa, припада групи инхибитора серинских протеаза и чини 1,5% протеина беланцета. По својим карактеристикама сличан је овомукоиду, а његова структура обухвата седам домена од којих сваки има сличан распоред дисулфидних веза као и овомукоид. Шест домена чини  $\alpha$ -домен, док седми који се налази на C-терминалном крају има карактеристике  $\beta$ -домена. Овоинхибитор подлеже термичкој денатурацији на температурама 69-72 °C. Осим инхибиције серинских протеаза, а захваљујући великом броју домена, постоји могућност инхибиције широког спектра протеаза: као нпр. трипсин, химотрипсин, протеаза бактеријског или гљивичног порекла, што значајно утиче на превенцију и заштиту од микроорганизама.<sup>24, 42</sup>

**Цистатин** се састоји од око 115 аминокиселина, а садржи 4 остатка цистеина која су повезана дисулфидним везама. Ове везе дају цистатину термичку стабилност. Инхибитор је цистеинских протеаза, као што су фицин, папаин, катепсин Б, катепсин Х, катепсин А, али инхибира и дипептидил пептидазу. На активност бромелина скоро и да не утиче. Разликују се две форме цистатина, означене као А и Б, које су имунолошки идентичне и не садрже угљене хидрате. Одређивањем кристалне 3D структуре цистатина применом, X-зрака при резолуцији од 2,0 Å, утврђено је да поседује  $\alpha$ -завојницу, пет ланаца  $\beta$ -наборане структуре и два дисулфидна моста. Идентификован је и регион (домен) карактеристичан за везивање протеаза (Слика 2.2в). Цистатин се користи као антимикуробни, антивирусни и инсектицидни агенс, али је примену нашао и у областима превенције емирагије и контроле метастаза.<sup>43-45</sup>

**Овогликопротеин** је по структури гликопротеин, који заузима свега 1% протеина присутних у беланцету, молекулске масе 24 kDa и изолетричне тачке на pI 3,9.<sup>46</sup> **Овомакроглобин** (тзв. **овостатин**) је такође по структури гликопротеин, који учествује са свега 0,5% у укупном садржају протеина беланцета. Сматра се другим по величини гликопротеином беланцета после овомуцина. Састоји се из четири субјединице једнаке молекулске масе (176 kDa на основу SDS-PAGE електрофореграма), од којих су сваке две повезане дисулфидним везама. Поседује способност инхибирања ендопротеаза укључујући и термолизин и колагеназу. По структури и механизму деловања овомакроглобулин је скоро идентичан са  $\alpha$ -2-макроглобулином из људског серума. Међусобна разлика огледа се у томе што овомакроглобулин није осетљив на присуство метиламина, чиме се пре свега испољава различита имуногеност. Доказано је да поседује бројна биолошка својства укључујући антибактеријске и антиинфламаторне активности, као и да се примењује у области лечења кератитиса.<sup>47-48</sup>

**Овофлавопротеин**, као и авидин, спада у групу протеина са способношћу везивања витамина, у овом случају рибофлавина (витамина Б2). Његову структуру чини 219 аминокиселинских остатака, распоређених у оквиру два домена (Слика 2.2б). Већи домен (N-терминални крај) обухвата првих 170 аминокиселина, док састав мањег домена (C-терминални крај) чине аминокиселински остаци од 171-219. Везујуће место рибофлавина налази се у већем домену. Овофлавопротеин садржи укупно девет дисулфидних мостова, који структуру протеина одржавају стабилном,

али доприносе и његовој термостабилности. Један дисульфидни мост повезује домене међусобно, а осталих осам улазе у састав рибофлавин везујућег места. Такође, овофлавопротеин обилује високим садржајем фосфатних група, сијалинском киселином и аминокиселинама са киселим бочним остацима.<sup>49-50</sup>



Слика 2.2. Кристална структура (а) авидина,<sup>51</sup> (б) овофлавопротеина<sup>50</sup> и (в) цистатина.<sup>45</sup>

### 3. БИОЛОШКИ АКТИВНИ ПЕПТИДИ

Према дефиницији, биолошки активним компонентама сматрају се оне супстанце (молекули) које се састоје од протеина, липида и/или угљених хидрата и имају способност да изазову биолошки одговор у ћелијама, као што су смањење хипертензије, спречавање настанка карцинома и/или, повећање чисте мишићне масе, стимулацију имуног система и инхибирање раста патогених микроорганизама. Осим наведеног, функционалне компоненте треба да имају и биолошку активност мерљиву на физиолошки реалном нивоу, односно да у опсегу концентрације у којој се налазе као дадаци функционалне хране или фармацеутика испољавају жељни ниво биолошке активности. Биоактивни пептиди могу се поделити на оне са сензорном, антиоксидативном, површински активном функцијом и оне са физиолошком функцијом. Протеини беланцета било у смеши или у облику појединачних изолованих протеинских фракција, сматрају се богатим извором биоактивних пептида.<sup>1,6</sup>



### 3.1. СТРУКТУРА И ФУНКЦИЈА БИОЛОШКИ АКТИВНИХ ПЕПТИДА

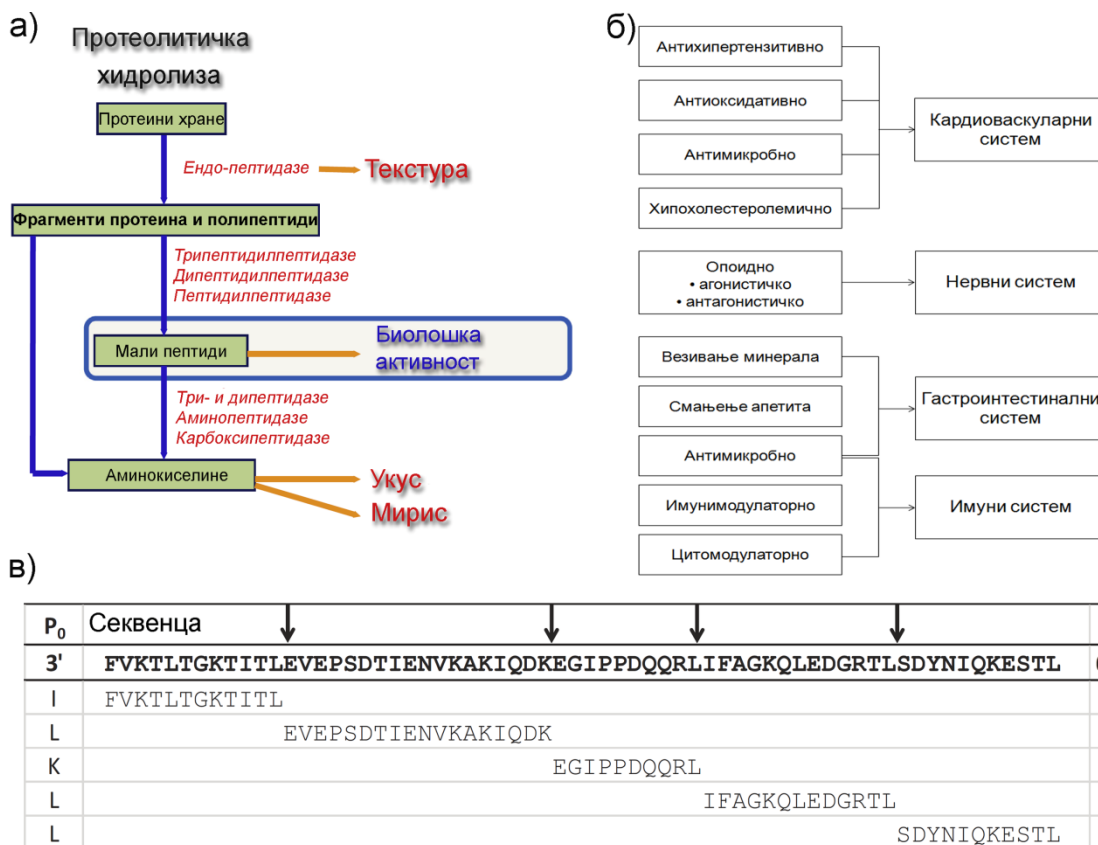
Биолошки активним пептидима сматрају се протеински фрагменти који су неактивни унутар секвенце иницијалног (нативног) протеина, а који се могу ослободити из протеина на више начина: 1) ензимском хидролизом ензимима дигестивног тракта као што су пепсин, трипсин и химотрипсин, 2) хидролизом током ферментационог процеса услед деловања бактеријских протеаза, 3) протеолитичком хидролизом применом пречишћених протеаза са ендо- и екзо-пептидазном активношћу или комбинацијом наведених начина.<sup>4, 52</sup> Произведени биолошки активни пептиди у својој секвенци садрже између 5 и 16 аминокиселинских остатака, а врста и редослед аминокиселина једино утичу на биолошку активност. Биоактивни пептиди поседују различите биолошке активности и лакше се интестинално апсорбују јер су боље растворни и мањих су димензија од полипептида и нативних протеина. Молекулска маса и структурне карактеристике, као што је хидрофобност, утичу на главне транспортне путеве код пептида. Са друге стране, што је молекулска маса пептида већа, то се смањује његова шанса да прође интестиналне баријере. Присуство биоактивних ди-, три- и олигопептида, ослобођених током парцијалне протеолитичке хидролизе ендо-пептидазама, будући да су изузетно растворљиви, омогућава њихову успешну имплементацију, како у виду смеше тако и појединачних, у најразличитије прехранбене производе, у циљу учинковитијег искоришћења биолошких активности. Произведени пептиди своју биолошку активност могу да испоље већ у интестиналном тракту или након апсорпције путем крвотока у циљаним ћелијским ткивима. Управо зато, неопходно је да током проласка кроз гастроинтестинални тракт пептиди остану стабилни, а своју биолошку активност испоље *in vivo* у циљаном месту деловања.<sup>52</sup>

Производња биоактивних пептида значајна је како за индустријску примену, тако и за научна истраживања. Како би се успешно изводила, аутори истичу да је неопходно задовољити неколико услова који се остварују кроз наредне фазе: 1) производња пептида задржавајући и/или унапређујући њихову биоактивност, 2) оптимизација и дизајнирање физиолошки подобног производа применом иновативних технологија, 3) примена биоинформатике у циљу убрзања и оптимизације производње прехранбених производа са биоактивним суплементима-

пептидима, 4) унапређење и побољшање функционалних и нутритивних својстава у циљу неутралисања горког укуса и лоше ароме насталих пептида, 5) заштита потрошача од штетних утицаја новонасталих производа успостављањем и употребом ригорозних законских процедура. Поред детектовања њихових повољних биолошких карактеристика по људско здравље, пре комерцијалне примене биоактивних пептида, неопходно је испитати и њихова могућа штетна дејства, за шта је у овом тренутку спроведено релативно мало истраживања. Генерално, највећи број биоактивних пептида производи се из нативних протеина који су присутни у људској исхрани јако дуго, без икаквих нежељених ефеката. Ипак, детаљнија истраживања у овом смеру су неопходна у циљу утврђивања њихове безбедне употребе.<sup>1,53</sup>

Иако садрже исте аминокиселине пептиди могу испољавати потпуно другачију биоактивност како због различитог конформационог облика, тако и због степена хидрофобности. Утврђено је да присуство пролина спречава даљу протеолизу пептидних фракција због његове изузетно чврсте конформације. Са аспекта укуса, биоактивни пептиди су најчешће безукусни или имају горак укус, изузетак су они који у својој структури садрже глутаминску и аспарагинску киселину са изузетно слатким укусом. Горак укус пептидна расте са повећањем хидрофобности и дужине пептидне секвенце. У појединим случајевима, биоактивни пептиди представљају значајно адекватнији и у погледу биорасположивости бољи извор есенцијаних аминокиселина у поређењу са нативним протеинима, па чак и са слободним аминокиселинама.<sup>1,6</sup>

Важно је истаћи да функција биолошки активних пептида у многоме зависи и од структуре нативног протеина из кога се добија било хемијском хидролизом, микробиолошким (ферментацијом) или ензимском парцијалном хидролизом. Стога, истраживања на тему делимичне денатурације нативних протеина у циљу структурне реорганизације хидрофобно/хидрофилних региона и конформационо лакше доступности дејству протеаза су нарочит фокус савремених научних студија.



Слика 3.1. Шематски приказ физиолошке функције и алтернативних механизма настајања биоактивних пептида, са примером идентификоване секвенце.<sup>4, 52</sup>

### АНТИОКСИДАТИВНИ ПЕПТИДИ

Присуство изузетно нестабилних радикала и реактивних кисеоничних врста (*на енгл. reactive oxygen species, ROS*) у организму резултира општећењем ћелијских ткива и доводи до болести као што су хипертензија, кардиоваскуларни проблеми, канцер, дијабетес, неуродегенеративне и инфламаторне болести. Антиоксиданти штите организм тако што инхибирају слободне радикале и ROS, а такође инхибирају реакције пероксидације липида, чиме спречавају оксидативно општећење. Када су у питању антиоксидативни пептиди изоловани из протеина хране доста је њих који имају антиоксидативну способност, а главни циљеви истраживања, од како је први пут 1960. године забележено ово својство, управо су се односили на њихову производњу. Антиоксидативни пептиди из хране сматрају се безбедним и здравим компонентама мале молекулске масе, који се одликују ниском ценом, високом активношћу и лако апсорпцијом. У поређењу са ензимима који реагују са слободним радикалима штитећи организм од оксидативног стреса, имају и друге предности као што су једноставнија структура и већа стабилност у различитим

срединама, и одсуство имунореакције. Осим антиоксидативних, ови пептиди испољавају и друга функционална својства чиме директно утичу на нутритивну и храњиву вредност производа. Тачан механизам антиоксидативне активности пептида још увек није у потпуности објашњен, али научне студије показују да су они инхибитори липидне пероксидације, „хватачи“ слободних радикала и хелатори прелазних метала.<sup>53-54</sup>

Веома јак антиоксидант изолован је из хидролизата рибљих протеина припремљеног пепсином, а биоактивни пептид, идентификоване секвенце Glu-Ser-Thr-Val-Pro-Glu-Arg-Thr-His-Pro-Ala-Cys-Pro-Asp-Phe-Asn, испољио је висок ниво инхибиције липидне пероксидације, већи и од  $\alpha$ -токоферола добро познатог антиоксиданта.<sup>55</sup> Сходно томе, истиче се да је антиоксидативни потенцијал пептида повезан са њиховим саставом, структуром и хидрофобношћу, и да су аминокиселински остаци Tyr, Trp, Met, Lis, Cis и His одговорни за испољавање антиоксидативне активности. Аминокиселине са ароматичним остатком могу учествовати у донирању протона слободним радикалима. Сматра се да пептиди који садрже His испољавају антиоксидативно својство кроз механизме донирања водоника, инхибирања липид-пероксил радикала, а самим тим и липидне пероксидације и/или механизам хелирања прелазних метала помоћу имидазолне групе. Такође, SH група цистеина има важну улогу у испољавању антиоксидативне активности услед директне интеракције са радикалима.<sup>54</sup> Штавише, наводи се да антиоксидативни пептиди поседују хидрофобне аминокиселинске остатке Val или Leu на N-терминалном крају, а да секвенцу чине Pro, His, Tyr, Trp, Met и Cys. Val или Leu на N-терминалном крају утичу на повећање заступљености пептида на граници фаза вода и уље, стабилизујући их и на тај начин олакшавајући „хватање“ слободних радикала у фази уља.<sup>56</sup> Показано је да пептиди који у својој секвенци садрже остатке Pro испољавају велику стабилност и отпорност приликом накнадне хидролизе дигестивним ензимима, због чега се могу користити као додаци функционалне хране.<sup>52</sup>

Међутим, важно је истаћи да није једино присуство одређених аминокиселина одговорно за антиоксидативну активност пептида, већ да и њихов редослед у полипептидном ланцу има значајну улогу. Тако је у истраживању које је обухватило синтезу антиоксидативног пептида насталог хидролизом конглицина, секвенце Leu-Leu-Pro-His-His, показано да његова антиоксидативна активност највише зависи од

His-His сегмента. Исто тако, утврђено је да његова активност опада уклањањем хистидинског остатка на C-терминалном крају. Студије су показале да свака промена у редоследу и саставу трипептида резултује другачијом антиоксидативном активношћу, али и то да одређене аминокиселине показују већу антиоксидативну активност када се налазе у облику дипептида. Осим наведеног, доказано је и да конфигурација пептида утиче на антиоксидативну активност, јер замена L-хистидина D-хистидином доводи до смањења активности. Тиме је, између осталог, показано да је положај имидазолне групе кључан фактор који одређује антиоксидативну активност.<sup>54, 56-57</sup> Трипептид изолован из хидролизата протеина беланцета, секвенце Ala-His-Lys, испољио је високу антиоксидативну активност идетиичну дипептиду секвенце Ala-His, док дипептид His-Lys и смеша конституентних аминокиселина су имале занемарљиво ниско антиоксидативно дејство. Поред свега наведеног, на антиоксидативну и биолошку активност уопштено значајно утичу оперативни услови током извођења хидролизе протеина, степен хидролизе, врста протеазе, начин изоловања пептида, структура пептида и његова концентрација. Већа антиоксидативна активност приписује се пептидима молекулске масе 0,5-1,5 kDa, у поређењу са пептидима молекулске масе мање од 0,5 kDa и веће од 1,5 kDa. Висока антиоксидативна активност излованих пептида у поређењу са слободним аминокиселина приписује се јединственим хемијским и физичким својствима потеклих од њихових аминокиселинских секвенци, посебно стабилношћу насталих пептидних радикала који не иницирају или пропацирају даље оксидативне реакције.<sup>56</sup>

Антиоксиданти се у прехраненој индустрији интензивно користе за редукацију липидне пероксидације чиме се спречава настанак споредних нуспроизвода оксидације хране и избегавају се нежељене текстурне промене хране, боје и/или укуса хране. Додатак антиоксидативних пептида представља велики изазов не само у погледу њихове активности, већ и у погледу њиховог утицаја на процес производње. Њихове сензорне карактеристике је неопходно узети у обзир при формулисању финалних суплемената хране, с обзиром да неки пептиди услед специфичне секвенце аминокиселина имају горак укус. Са аспекта укуса, истраживачи истичу да се хидролизом нативних протеина са папином образују веће количине глутаминске и аспарагинске киселине на терминалним крајевима, у поређењу са хидрофобним остацима карактеристичним за хидролизу алкалазом. Зато се пептиди произведени папином иако мањих антиоксидативних својстава издавају као пожељнији за

употребу у виду суплемената функционалне хране наспрам пептида добијених хидролизом са алкалазом.<sup>55</sup> У Табели 3.1 сумарно су, на основу прегледа доступне литературе, приказани само неки од изолованих пептида са антиоксидативним својствима који се могу користити као суплементи функционалне хране.

Пошто се протеински хидролизати производе од природно доступних нативних протеина хране за које нису идентификована нежељена и/или ризична својства, примену протеинских хидролизата не треба ограничавати регулаторним прописима са аспекта дозвољених доза и употребе, као што је то случај са бутилен хидроксианизолом (ВНА), бутилен хидрокситолуеном (ВНТ) и осталим синтетским антиоксидантима. Заправо, за разноврсне хидролизате биљних протеина дозвољено је да буду инкорпорирани у специфичну храну као прехранбени адитиви у САД (FDA, 2011), док су у већини земаља дозвољени за употребу у виду састојака хране. Међутим, када процес производње протеинских хидролизата или специфичних фракција пептида доводи до значајних промена у саставу, структури и/или нивоу нежењених једињења која утичу на нутритивну вредност, метаболизам или безбедност хране, регулативе налажу да се такав производ мора евалуирати од стране надлежних органа пре него што се пусти у продају на тржишту. Такође, горчину и остале органолептичке недостатке, као и стабилност антиоксидативних пептида током прераде и складиштења хране, треба проценити пре комерцијализације одређеног протеинског хидролизата као суплемента прехранбених производа.<sup>56</sup>

**Табела 3.1.** Антиоксидативна активност хидролизата прехранбених протеина и изолованих пептида.

Извор протеина	<i>In vitro</i> метода одређивања антиоксидативне активности	Протеаза	Идентификовани антиоксидативни пептиди	Референца
Беланце	Инхибиција пероксидације линолне киселине	Amano S из <i>Bacillus subtilis</i>	АНК, VНН, VННАНЕН	58
Пшенични глутен	Инхибиција пероксидације линолне киселине	Пепсин	LQPGQGQQG, AQIPQQ	59
Сирово беланце	ORAC, Cu <sup>2+</sup> -индукована оксидација липопротеина мале молекулске масе	Пепсин	YAEERYPII	60

Табела 3.1. Наставак

Беланце гушчијих јаја	DPPH, хелирање јона метала	Више различитих протеаза	STMMEERRMKVY, DVFRELRVQ	61
Беланце	DPPH	Папаин	YLGAK, GGLEPIDFQ	62
Беланце	ORAC	Протеаза Р	AEERYP, DEDTQAMP	63
Јечмени глутенин	DPPH, хидрохил радикал, хелирање јона метала	Алкалаза	QKPFPPQPPF, PQIPEGF, LRTLPL, SVNPL	64
Протеини остриге	Водоник-пероксид, хидрохил радикал, DPPH	Протеаза из <i>Bacillus cereus</i> SU12	LANAK, PSLVGRPPVGLTL, VKVLEHPVL	65
$\alpha$ -лактабумин и $\beta$ -лактоглобулин	ORAC	Королаза РР, пепсин, трипсин, хмотрипсин, темолизин	WYSLAMAASDI	66
Зеин протеин	DPPH, ABTS, супероксид анионски радикал	Алкалаза	YA, LMCH	67
Протеини пиринчаног ендосперма	супероксид анионски и хидрохил радикал, DPPH, инхибиција липидне проксидације	Алкалаза, Неутраза, хмотрипсин, папаин, флеворзим	FRDENKK, KHNRGDEF	68

### АНТИПРОЛИФЕРАТИВНИ ПЕПТИДИ

Већина познатих синтетичких антиканцерогених лекова повезана је са нефротоксичним, неуротоксичним, кардиотоксичним и гонадотоксичним нежељеним ефектима код пацијената. Због наведених тешких облика нежељених ефеката, потражња за биоактивним пептидима из нативних протеина хране са антиканцерогеним својствима значајно је повећана последњих година.<sup>6, 69</sup> Стога, велика пажња научних истраживања посвећена је управо изоловању пептида са антиканцерогеним својствима, док је развој антитуморски и антиканцерогени лекова најважнији са аспекта производње многих фармацеутских компанија. Наведено је важно из разлога што су терапијске могућности антиканцерогених терапеутских лекова и даље ограничене због потешкоћа у селективном усмеравању деловања лекова на ћелије карцинома и здраве ћелије.<sup>55</sup>

Пептиди који имају антитуморску активност могу се класификовати у 2 основне групе: 1) пептиде са селективном активношћу, који инхибирају бактерије и карценогене ћелије, али не утичу на раст здравих ћелија и 2) пептиде са неселективном активношћу, који инхибирају бактерије, канцерогене ћелије и здраве ћелије. Када је у питању механизам деловања пептида са селективном активношћу, истраживачи истичу да постоје фундаменталне разлике између мембрана малигних ћелија и нормалних ћелија које омогућавају селективност ове групе пептида да нападну карциногене ћелије без утицаја на здраве ћелије. Малигне ћелије обично имају негативно наелектрисање због веће експресије анјонских молекула као што су фосфатидилсерин и муцин (гликопротеин) у поређењу са нормалним ћелијама. Међутим, нормалне ћелије нису под утицајем пептида, пошто имају неутрално површинско наелектрисање које потиче од zwitter јонске природе већине мембранских компоненти као што су фосфатидилетаноламин (познатији и као цефалин), фосфатидилхолин и сфингомијелин. Осим тога, канцерогене ћелије имају већу површину од здравих ћелија због присуства већег броја микровилуса, прстоликих израштаја на површини ћелијске мембране, неправилних по величини и облику. Микровилуси могу омогућити везивање пептида и карциногенних ћелија. Неселективна активност друге групе пептида резултат је њихове способности да узрокују општењења негативно наелектрисаних мембрана, као и мембрана zwitter јонске природе. Том приликом пре свега се истичу електростатичке интеракције између позитивно наелектрисаног пептида и негативно наелектрисаних фосфолипида у ћелијској мембрани малигних ћелија. Садржај хидрофобних аминокиселинских остатака је од изузетне важности јер су истраживања показала да пептиди са већим садржајем аргинина у односу на пептиде са већим садржајем лизина испољавају већи цитотоксични ефекат на ћелије еритроцита и ћелије сисара.<sup>70</sup>

Далири (Daliri) и коаутори истичу да је неопходно спровести више истраживања у којима би се тестирала цитотоксичност антиканцерогених пептида на нормалним ћелијама и тиме потврдила безбедност пептида у антиканцерогеним производима. Прегледом литературе утврђено је да је антипролиферативна активност већине биоактивних пептида анализирана *in vitro* методама, и да се веома мало зна о *in vivo* активностима ових пептида, због чега су управо студије у погледу антиканцерогеног деловања пептида на моделу експерименталних животиња



оправдане.<sup>6</sup> Ипак, неопходно је истаћи да биоактивни пептиди са антиканцерогеним својствима и својом способношћу да убијају или контролишу раст и пролиферацију канцерогених ћелија, имају значајан потенцијал у погледу унапређења здравственог стања, а након опсежних студија могу се у фармацеутској индустрији инкорпорирати у виду лекова нове генерације.

Када је реч о протеинима са антиканцерогеним својствима и клиничким студијама, за разлику од биоактивних пептида, прегледом доступне литературе забележено је следеће. Инхибитор протеазе познат и као *на енгл.* Bowman-Birk protease inhibitor-BBI, у води растворљив протеин изолован из махунарки и многих монокотиледоних семена, испољио је антиканцерогену активност у *in vitro* тестовима и тестирањем на експерименталним модел животињама, те се тренутно испитује са аспекта хемопреентивног агенса у клиничким студијама канцера. Сојин Куницов (*на енгл.* Kunitz) инхибитор трипсина, други инхибитор протеаза, довео је до сузбијања раста ћелија рака јајника блокирајући урегулацију урокиназе. Лактоферин и лактоферицин из говеђег млека инхибирали су метастазу плућа и ангиогенезу трансплантираних ћелија меланома, лимфома и колоректалног карцинома код мишева. Лектини из екстракта беле имеле (*на енгл.* mistletoe extract) такође су испољили снажан антиканцероген ефекат код ћелија миша. Антиканцерогена својства наведених протеина, могу се, барем делимично, приписати шифрованим биоактивним пептидима. За лунасин, нови хемопреентивни пептид из соје, утврђено је да потискује хемијско-карциногену и вирусно-онкогено индуковану трансформацију ћелија сисара и да инхибира канцер коже код мишева. Лунасин садржи 43 аминокиселинска остатка, од којих 9 чине остаци аспарагинске киселине на C-терминалном крају, затим трипептид Arg-Gly-Asp који се везује за ћелије и хеликс чија је структура слична региону протеина који везују хроматин.<sup>71</sup>

### **АНТИХИПЕРТЕНЗИТИВНИ ПЕПТИДИ**

Ангиотензин-конвертујући ензим (*на енгл.* angiotensin-converting enzyme-ACE; EC 3.4.15.1), односно пептидаза P је неспецифична дипептидил карбоксипептидаза, по структури гликопротеин, а присутна у телесним течностима и многим ткивима. Може се наћи у два облика: соматском и тестисном. Последњих година, идентификован је и трећи облик назван ACE-хомолог. ACE катализује конверзију неактивног ангиотензин I (декапептида) у ангиотензин II (октапептид), чиме се повећава вазоконстрикторско дејство и има важну физиолошку улогу у регулисању

крвног притиска и равнотеже течности и соли код сисара.<sup>71</sup> ACE је по механизму деловања егзо-пептидаза која хидролизује пептидне везе уклањањем дипептида са C-терминалног краја. ACE је цинк-металопептидаза активирана у присуству хлора и претпоставља се да функција анјонске активације обезбеђује високу *in vitro* специфичност према супстрату.<sup>52,72</sup>

Научно је доказано да је исхрана директно повезана са кардиоваскуларним болестима, од којих је једна од најчешћих артеријска хипертензија, која се често јавља са другим поремећајима метаболизма као што су гојазност, преддијабетес, атеросклероза. Висок притисак се лечи лековима који су заправо синтетички ACE-инхибитори, као што су беназеприл, каптоприл, еналаприл, фосиноприл, лизиноприл, зестрил, моексиприл, периндоприл, кванаприл, акуприл, рамиприл и трандолаприл. Иако се неколико биоактивних синтетичких пептида користи за клиничку терапију хипертензије и срчане инсуфицијенције, ови пептиди су скупи и испољавају бројна нежељена дејства. Стога, биоактивни пептиди, природни ACE-инхибитори, намећу се као погодна алтернатива јер су релативно јефтине производи са ниједним или мањим пратећим нежељеним ефектима. У оквиру људске исхране, пептиди који показују ACE-инхибиторну активност, потичу из неколико различитих извора, тј. ови пептиди се могу наћи у оквиру протеина пореклом из: 1) млека и млечних производа, 2) јаја, 3) меса и рибе и 4) биљака.<sup>73</sup> Већина антихипертензивних пептида су обично кратки пептиди који имају пролински остатак на C-терминалном крају. Остаци пролана помажу пептиду да задржи стабилност и активност током деловања гастроинтестиналних ензима. На пример, добро познати антихипертензивни пептиди, трипептиди Ile-Pro-Pro и Val-Pro-Pro добијени из киселог млека, имају чак по два остатка пролина. Студије клиничког испитивања показале су да ова два трипептида позитивно утичу на здравље смањењем систолног и дијастолног крвног притиска код хипертензивних пацијената. Четири ACE-инхибиторна пептида Ile-Tyr, Arg-Ile-Tyr, Val-Trp и Val-Trp-Ile-Ser, изолована из хидролизата протеина уљане репице добијеног коришћењем субтилизина, спонтано снижавају крвни притисак код хипертензивних пацова након оралне примене, са максималним ефектом примећеним између 2 и 4 сата.<sup>55,72</sup>

Иако потичу из различитих нативних протеина, чини се да сви ACE-инхибиторни пептиди деле заједничку структуру, тј. присуство хидрофобних (ароматичних или разгранатих бочних ланаца) аминокиселинских остатака као

последње три аминокиселине на C-терминалном крају, као и да лизин/аргинин на C-терминалном крају са позитивним наелектрисањем доприносе укупној инхибиторној активности. Механизам инхибиције АСЕ заснива се на деловању преко два каталитичка центра који имају различиту специфичност према супстрату; хидрофобни аминокиселински остаци пептида везују се на N-терминалном каталитичком центру ензима, док се хидрофилни аминокиселински остаци пептида везују на C-терминални каталитичком центру.<sup>71</sup> Неки пептиди су активни *in vitro*, али су неактивни *in vivo*. Губитак активности приписује се њиховој деградацији услед дејства интрацелуларних пептидаза или ензима из дигестивног тракта или крвног серума, док је други разлог њихова разградња у јетри. Антихипертензивна активност пептида већих молекулских маса може бити последица њихове хидролизе на краће, активне фрагменте. Краћи фрагменти, као што су ди- и трипептиди, се апсорбују из црева и директно интерагују са одговарајућим рецепторима. У поређењу са синтетичким лековима, већа активност пептида *in vivo* него *in vitro* може бити последица већег афинитета ткива или њихове спорије елиминације из организма.<sup>69</sup>

Разлика између степена АСЕ-инхибиције *in vitro* и снижавања крвног притиска *in vivo* доводи до тога да се пептиди могу класификовати у три категорије. Прва категорија представља „тип правих инхибиторних пептида“, чија активност изражена преко  $IC_{50}$  није умањена преинкубацијом са АСЕ. Примери оваквих пептида су Tyr-Leu и Tyr-Lis-Trp. Друга категорија су такозвани пептиди „супстратног типа“. Ови пептиди након инкубације са АСЕ хидролизују и показују ослабљену или никакву АСЕ-инхибиторну активност. На пример, АСЕ-инхибиторна активност ( $IC_{50}$ ) пептида Phe-Lys-Gly-Arg-Tyr-Tyr-Phe је била  $0,55 \text{ mol/dm}^3$ . Ова вредност се, након хидролизе пептида са АСЕ на фрагменте Phe-Lys-Gly, Arg-Tyr и Tyr-Phe, повећала на  $34,0 \text{ mol/dm}^3$ , што значи да је активност ослабила. Трећа категорија, „pro-drug“ тип инхибитора, укључује пептиде који су прекурсори правих инхибиторних пептида, који се ослобађају тек услед присуства АСЕ или протеаза дигестивног тракта. Пример овакве секвенце је Leu-Lys-Pro-Asn-Met са вредношћу  $IC_{50} 2,40 \text{ mol/dm}^3$ . Хидролизом овог пептида у присуству АСЕ излован је трипептид Leu-Lys-Pro са  $\sim 8$  пута већом активношћу од почетног пептида ( $IC_{50}=0,32 \text{ mol/dm}^3$ ). Наведена подела указује на то да пептиди сврстани у прву и трећу категорију могу довести до снижавања крвног притиска код експерименталних пацова са хипертензијом.<sup>73</sup>

Антихипертензивни пептиди обећавајући су за инкорпорирање у додатке функционалне хране и фармацевтске оралне лекове, где се као такви могу користити у превенцији и лечењу хипертензије. Својим деловањем могу помоћи у регулисању равнотеже течности и соли. Међутим важно је повести рачуна о њиховој биорасположивости, која се може сачувати микроинкапсулацијом у липозомима или побољшати заменом одговарајућих аминокиселинских остатака другим отпорнијем као што су триптофан или пролин.<sup>69, 73</sup>

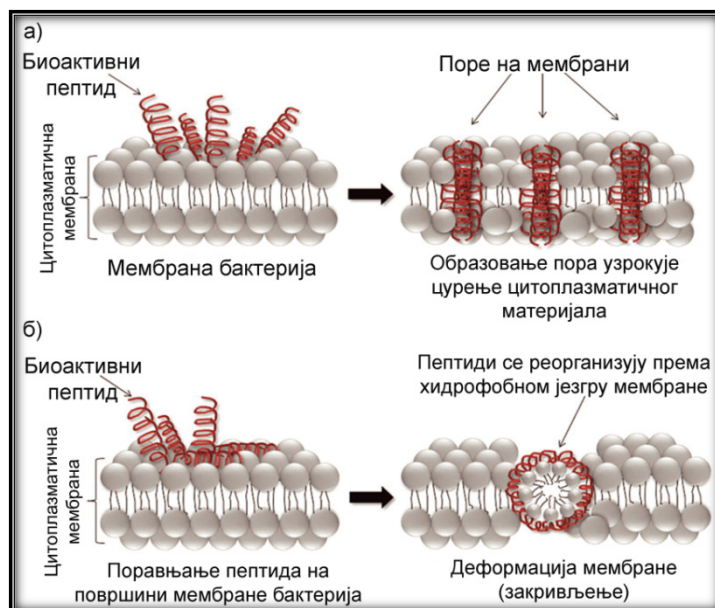
### **АНТИМИКРОБНИ ПЕПТИДИ**

Пептиди са антимикуробним својствима идентификовани су у широком спектру нативних протеинских извора било животињских или биљних. Механизам деловања и ефикасност биолошки активних пептида као антимикуробних средстава варирају у зависности од њихових структурних карактеристика, тј. величине пептида, аминокиселинског састава, наелектрисања, хидрофобности и секундарне структуре. Штавише, биоактивни пептиди испољавају различиту селективност и осетљивост на циљне микроорганизме. Генерално, антимикуробни пептиди изведени из животиња показују инхибиторну активност на знатно већем спектру микроорганизма у односу на оне произведене из бактерија, док пептиди изоловани из биљних извора показују већу ефикасност при изузетно ниским концентрацијама чак и на наномоларном нивоу.<sup>71</sup>

Антимикуробни пептиди су релативно кратки (између 10 и 50 аминокиселинских остатака), хидрофобних и катјонски. Чак 50% чине хидрофобни аминокиселински остаци. С обзиром да поседују базне аминокиселине лизин и аргинин, врло често укупно наелектрисање антимикуробних пептида је позитивно. Природна једињења са антимикуробним активностима делују различитим механизмима; међутим, већина антимикуробних биоактивних пептида делује на микробе било пенетрацијом и поремећајем интегритета микробне мембране или транслоцирањем преко мембране и деловањем на унутрашњим местима. Иако су идентификовани из великог броја извора, посебно се издвајају пептиди изолованих из хидролизата млечних протеина.<sup>55</sup> С обзиром да тачан механизам деловања антимикуробних пептида на микроорганизме и ћелије није познат, истраживачи су изнели различите претпоставке начина на који пептиди делују на ћелијски зид. Ради прегледности, претпостављени механизми, приказани су на Слици 3.2.<sup>70</sup>

Антимикробни пептиди привлаче велико интересовања за потенцијалну примену у очувању свежине хране и терапеутске сврхе у здравственој заштити. Наиме, толерантност микроорганизама на низак рН и висок садржај соли представља велики изазов за контролу патогена са прехранбеним производима, пошто традиционално конзервирање хране има ограничену ефикасност у инхибицији раста микроорганизама. Стога, неопходно је увођење нових антимикробних средстава, нарочито оних природног порекла, како би се наведено надоместило. Биоактивни пептиди са антимикробним својствима, као што су они произведени ферментацијом у присуству бактерија млечне киселине и пептиди протеина хране, добри су кандидати за прехранбене адитиве. Предности антимикробних пептида у односу на хемијске конзервансе укључују пре свега мање уношења штетних ефеката, мањи интензитет потребног топлотног третмана (минимална процесна обрада) и задржавање органолептичких и нутритивних својстава хране, као што је мања киселост и/или нижи садржај соли. У терапеутским апликацијама, антимикробни пептиди су супериорнији од конвенционалних бактеријских антибиотика јер убијају бактерије брже и нису погођени механизмима отпорности, тј. резистенције на антибиотике којима се често сусрећу други антибиотици.<sup>55, 69</sup> Најбољи истражен антимикробни пептид је фрагмент 17-41 лактоферина, познатији као лактоферицин. Различите антимикробне функције су приписане казеин макропептиду који се формира током производње сира или варења  $\kappa$ -казеина. Четири пептида Gly-Phe-His-Ile, Asp-Phe-His-Ile-Asn-Gly, Phe-His-Gly и Gly-Leu-Ser-Asp-Gly-Glu-Trp-Gln изолована из говеђег меса анализирана су на антимикробне активности шест патогених бактерија, три Грам-позитивне (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus*) и три Грам-негативне (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*) бактерије, при чему је пептиди GLSDGEWQ инхибирао раст *S. typhimurium*, *B. cereus*, *E. coli* и *L. monocytogenes*, од. бактеицидно је деловао на обе врсте бактеријског сојева.<sup>69</sup>

Сумарно, ради лакше прегледности, неки од најзначајних примера комерцијално доступних функционалних намирница и прехранбених састојака који садрже биолошки активне пептиде са аспектом на њихову терапеутску сврху, приказани су у Табели 3.2.



Слика 3.2. Претпостављени механизми деловања биоактивних пептида на ћелије микроорганизама: а) модел образовања „ламела“ у мембрани (на енгл. barrel-stave model) и б) модел образовања „покривача“ (на енгл. carpet model).<sup>70</sup>

Табела 3.2. Примери комерцијално доступних функционалних намирница и прехранбених састојака са биолошки активним пептидима.<sup>74</sup>

Назив производа	Произвођач	Врста хране	Биоактивни пептиди	Терапеутска сврха
Calpis AMEEL S	Calpis Co., Јапан	Кисело млеко	VPP, IPP из $\beta$ - и $k$ -CN	Хипотензивно
Evolus	Valio, Финска	Ферментисано млеко, обогачено калцијумом	VPP, IPP из $\beta$ - и $k$ -CN	-
BioZate	Davisco, САД	$\beta$ -LG хидролизат	Пептиди сурутке	-
C12 Peption	DMV, Холандија	Састојак	Додекапептид из казеина FFVAPFPEVFGK	-
Peptide Soup	NIPPON, Јапан	Супа	Пептиди из бонита	-
Casein DP Peptio Drink	Kanebo, Јапан	Освежавајуће пиће	Додекапептид из казеина FFVAPFPEVFGK	-
BioPURE-GMP	Davisco, САД	Хидролизат протеина сурутке	Гликомакропептид	Антикариогено, антимикумно, антитромбинско
CholesteBlock	Kyowa Hakko, Јапан	Пиће у праху	Пептиди соје везани за фосфолипиде	Хипохолестеролемично

**Табела 3.2. Наставак**

CSPHP ProDiet F200	Ingredia, Француска	Млеко, кондиторски производи	$\alpha_{S1}$ -CN (фрагмент 91–100)	Умањује стрес
Capolac	Arla Foods, Данска	Састојак	CPP	Потпомаже апсорпцију минерала
Tekkotsu Inryou	Suntory, Јапан	Освежавајуће пиће	CPP	-
Kotsu Kotsu calcium	Asahi, Јапан	Освежавајуће пиће	CPP	-
Glutamin peptide	DMV, Холандија	Хидролизат протеина млека	CPP (20%)	Имуномодулато- рно

### **3.2. БИОЛОШКИ АКТИВНИ ПРОТЕИНИ/ПЕПТИДИ БЕЛАНЦЕТА**

Протеини беланцета припадају групи протеина из који је изолован и идентификован велики број биолошки активних пептида. Том приликом за изоловање најчешће су коришћени хидролизати протеинских фракција беланцета, као што су: овалбумин, овотрансферин, лизозим, овомукоид, овомуцин, авидин. Међутим, треба истаћи да и сами протеини беланцета испољавају биолошке активности, сумиране у Табели 3.3. Протеинске фракције беланцета испољавају биолошке активности посредством физиолошки активних пептида који настају током *in vivo* гастроинтестиналне дигестије или *in vitro* протеолитичком хидролизом. Ови физиолошки активни пептиди беланцета неактивни су у склопу секвенце нативног протеина, али се након хидролизе могу ослободити. Једном ослобођени, пептиди могу деловати као регулаторна једињења и испољавати различите активности као што су антихипертензивна, антипролиферативна, антимикробна, антивирална и имуномодулаторна активност.<sup>8,75</sup>

Табела 3.3. Биолошка активност протеинских фракција беланцета.<sup>75</sup>

Протеини беланцета	Масени удео (%)	Биолошка активност
Овалбумин	54,0	Антибактеријска и имуномодулаторна активност, антихипертензивна активност пептида из овалбумина
Овогрансферин	12,0	Антимикробна и имуномодулаторна активност, антибактеријска активност изолованог пептида
Овомукоид	11,0	Инхибитор серинске протеазе, имуномодулаторна активност
Овомуцин	3,5	Антимикробна активност, антитуморска активност, антиадхезивна својства
Лизозим	3,4	Антибактеријска, антивирална, имуномодулаторна и имуностимулативна активност, антитуморска антимикробна активност
Авидин	0,05	Антибактеријска активност

### АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ

Беланце садржи протеине са доказаном антимикуробном активношћу, који делују као део природног одбрамбеног система јајета. Овакво дејство може бити последица неколико механизма, укључујући лизу бактеријске ћелије, везивање метала и везивање витамина.

**Лизозим** испољава бактериолитичко дејство, тако што врши хидролизу  $\beta(1-4)$  везе између *N*-ацетилмураминске киселине и *N*-ацетилглукозамина пептидогликана, структурних компонената бактеријског ћелијског зида. Ово својство омогућава његову употребу у продужењу рока трајања одређених намирница, при чему је најефикаснији према Грам-позитивним бактеријама као што су *Bacillus stearothermophilus* (данас *Geobacillus stearothermophilus*), *Clostridium tyrobutyricum*, и *Clostridium thermosaccharolyticum*. Међутим, спектар његовог дејства може се и проширити када се користи везан са другим једињењима као што су етилендиаминтетраацетат (EDTA), органске киселине или ницин. Забележено је да се приликом везивања перилалдехида (природан фенолни алдехид) са лизозимом значајно појачава антибактеријска активност према Грам-позитивним (*S. aureus*) и Грам-негативним бактеријским сојевима (*E. coli*). Ензимском хидролизом лизозима поспешује се његова антимикуробна активност, тако што ослобађају секвенце протеина са овим својствима и продукују се пептиди са



овом активношћу. Пептиди који одговарају аминокиселинским секвенцама у позицијама 98-112, 98-108 и 15-21 инхибирају раст *E. coli* и *S. aureus*, док синтетички бактерицидни полипептиди из лизозима не само да доводе до општећења бактеријске мембране, већ и инхибирају синтезу ДНК и РНК. Антибактеријско својство лизозима условило је његову примену у козметичким производима за оралну хигијену, као што су пасте за зубе, течности за испирање уста и жваке, затим у средствима за превенцију бактеријских инфекција и периодонтитиса узрокованог бактеријама. Лизозим такође испољава и антивиралну активност, па се орална и спољашња употреба лизозима показала се као веома ефикасна у превенцији и контроли неколико кожных вирусних инфекција, као што су херпес симплекс и варичеле, чак се наводи да лизозим показује активност против HIV-а типа I.<sup>8, 75</sup> Друге студије показале су да се термичком обрадом антимикробна својства лизозима побољшавају, а претпоставља се да је полимеризација лизозима одговорна за широк спектар деловања. Штавише, пептиди који су изоловани из примарне секвенце лизозима хидролизом протеазама показали су бактериостатичку активност независно од активности лизозима.<sup>75</sup>

Пептиди произведени ензимском хидролизом **овалбумина**, као и његови синтетички фрагменти, имају изражено антимикробно дејство према *Bacillus subtilis*, док умерено антимикробно дејство испољавају према бактеријским сојевима *E. coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, и ћелијским културама квасаца *Candida albicans*.<sup>8</sup> **Овотрансферин** је протеин из групе трансферина, протеина који реверзибилно везују јоне гвожђа и веома су распрострањени у различитим биолошким флуидима. Сматра се да овај протеин уклања гвожђе, што онемогућава његову употребу од стране микроорганизама, а може бити и посредник за испоруку гвожђа. Овај протеин је показао антибактеријску активност широког спектра деловања, укључујући *Pseudomonas spp.*, *E. coli*, *Streptococcus mutans*, *S. aureus*, *B. cereus* и *Salmonella enteritidis*. Овотрансферин доспева до унутрашњег дела ћелијске мембране и изазива селективну пермеабилност јона и слабљење електронског потенцијала мембране и на тај начин испољава своје антибактеријско деловање. Такође, овотрансферин је показао антивирусну активност против вируса Марекове болести у фибробластима шлећих ембриона. Употреба овотрансферина као антибактеријског агенса је знатно јефтинија, економски исплативија и оправданија у односу на употребу лактоферина, па су велике могућности да добије GRAS статус исто као и

лактоферин.<sup>8</sup> **Авидин**, за које већ речено да поседује способност специфичног везивања у води раствораног биотина, чиме инхибира раст бактерија које захтевају биотин, као и квасаца. **Овомуцин** и изоловани пептиди спречавају ширење микроорганизама, али поседују и антивиралну активност против вируса Њукастлове болести, говећег ротавируса, и HIV-а при *in vitro* условима.<sup>75</sup>

### **ИМУНОМОДУЛАТОРНА АКТИВНОСТ**

Имуни систем способан је да одговори на стимулансе антигена, а тај процес укључује Б ћелије, Т ћелије и фагоците. У регулисању имуних одговора цитокини и фактори раста имају важну улогу. Истовремено они су повезани са патологијом широког спектра болести и потенцијално се могу употребити у терапији мењања имуног одговора. Испоставило се да неколико протеина и пептида беланцета испољавају имуномодулаторну активност. За **овалбумин** је утврђено да индукује ослобађање фактора некрозе тумора  $\alpha$  (*на енгл.* tumor necrosis factor) уколико се модификује са метилглиоксалом, реактивним дикарбонилним једињењем, док се имуногени пептиди овалбумина користе за побољшање имуног одговора у имунотерапији канцера. Поред тога, пептиди **овомуцина** су *in vitro* условима показали макрофаг-стимулативну активност. За **лизозим** се показало да може деловати имуномодулираторно и имуностимулаторно. Када се користи у имунотерапији лизозим ефикасно побољшава стање хроничног синуситиса и нормализује хуморални и целуларни одговор код пацијената са хроничним бронхитисом. **Овотрансферин** може деловати као имуномодулатор мењајући функционисање макрофага и хетерофилних ћелија *in vitro*. Други имуномодулаторни ефекти овотрансферина су се испојили приликом инхибиције пролиферације лимфоцита слезине миша и побољшаног фагоцитног одговора периферних моноклеарних ћелија крви и полиморфонуклеарних ћелија код паса. **Цистатин** такође може бити укључен у процесе инфламације и имуног одговора кроз мрежу цитокина, преко механизма повезаних са познатим регионима у молекулу за инхибицију протеаза.<sup>8,75</sup>

### **АНТИКАНЦЕРОГЕНА АКТИВНОСТ**

**Лизозим** је веома проучаван у погледу антиканцерогених својстава и утврђено је да инхибира формирање и раст тумора, у случају *in vivo* и *in vitro* спроведених анализа, тј. уколико се уноси орално и у случају испитивања туморских ћелијских линија, као што је ћелије канцера плућа. Осим тога, лизозим поспешује ефикасност

хемотерапије, и делује превентивно када се администрира здравим мишевима. Претпоставља се да лизозим делује на имуни систем домаћина, укључујући активацију макрофага и на тај начин инхибира раста тумора. Међутим, скорија научна истраживања указују на то да лизозим може да делује и директно на саме ћелије тумора.<sup>8</sup>

### **ИНХИБИТОРИ ПРОТЕАЗА**

Протеазе имају важну улогу у неколико физиолошких процеса, укључујући интрацелуларну деградацију протеина, зарастање костију, приказивање антигена, и њихове активности су повишене код патофизиолошких стања као што су метастазе канцера и упале. Такође су неопходне и услед деловања непожељних микроорганизама. Микробне протеазе су укључене у механизам пенетрације бактерија у ткива домаћина, протеолитско цепање прекурсорских протеина за репликацију вируса, и за олакшану инвазију домаћина од стране паразита. Стога, инхибитори протеаза представљају важну групу компонената пре свега терапеутског значаја. Идентификована су четири инхибитора протеаза у беланцету: цистатин, овомукоид, овомакроглобулин (или овостатин), и овоинхибитор.<sup>8, 23</sup>

**Овомакроглобулин** поседује широки спектар инхибиторне активности према различитим типовима протеаза, укључујући серинске протеазе, цистеинске протеазе, тиолне протеазе и металопротеазе. Такође, испољио је инхибиторну активност *S. marcescens* и *P. aeruginosa*, у *in vitro* и *in vivo* условима. Од терапеутских својстава утврђено је да редукује деструкцију рожњаче код зечева са кератитисом и да убрзава зарастање рана. **Цистатин и овоинхибитор** (инхибитори серинских протеаза) спречавају инфекције ротавирусом код мишева, а за цистатин је утврђено да инхибира деловање полиовирусне протеазе, ефективно инхибирајући репликацију вируса *in vitro*. Цистатин је способан да значајно редукује бројност паразита код испитиваних мишева са леишманијом. Цистатини инхибирају активности везане за туморе, које су везане за интрацелуларне цистеинске протеазе због чега се сматрају потенцијалним лековима против канцера. **Овомукоид** је инхибитор серинске протеазе и показало се као наочито користан приликом оралне примене протеинских и пептидних лекова, при чему је њихова примена иначе ограничена услед потпуне протеолитске деградације у гастроинтестиналном тракту. Овомукоид инхибира дигестивне ензиме, трипсин,  $\alpha$ -химотрипсин и еластазу, услед чега да побољшава терапеутско дејство оралног уношења инсулина. Поред тога, испитан је и са аспекта уноса калцитонина,

полипептида који је у вези са хомеостазом калцијума и зарастањем костију, а који је такође коришћен и у терапији код остеопорозе. Протеолитски ензими, нарочито цистеинске протеазе, укључени су у ресорпцију костију, док је за цистатин потврђено да инхибира деградацију коштаног матрикса и ослобађање калцијума *in vitro* условима. Осим претходно наведеног, за протеазе је сматра да могу допринети озбиљним оболењима, као што су НiV и Алцхајмер, што опет показује колико важну улогу у људском здрављу могу имати инхибитори протеаза пореклом из нативних протеина беланцета.<sup>23</sup>

### **БИОСПЕЦИФИЧНИ ЛИГАНДИ**

**Авидин** се у тераписке сврхе користи при лечењу канцера, у циљу локације и мапирања ћелија како би се олакшало циљно деловање примењених антитуморских лекова. Ово мапирање тумора помоћу авидина показало се врло ефикасно за побољшање активност фактора некрозе тумора  $\alpha$ , везаног за биотин. Такође, радиоактивно обележен авидин везује се за лектине који се јављају на туморским ћелијама и тако их прецизно и брзо локализује. На овај начин могуће је смањити акумулацију радиоактивности у другим околним ткивима. Осим авидина, и за **овомукоид** је утврђено да поспешује циљно деловање лекова кроз крвоток, тако што делује као биоспецифични лиганд на лектине на зидовима гастроинтестиналног тракта.<sup>23</sup>

### **АНТИХИПЕРТЕНЗИТИВНА АКТИВНОСТ**

Научним истраживањима утврђено је да неки пептиди пореклом из протеина беланцета имају улогу у контролу развоја хипертензије преко механизма деловања на вазодилатацију. Вазодилатативни пептид, **овокинин** (Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu) је изолован током хидролизе овалбумина (овалбумин-ОА) химотрипсином, и заједно са секвенцом овалбумина 359-364, испољава антихипертензивно дејство. Конкретно, они значајно снижавају систолни крвни притисак код пацова са спонтаном хипертензијом, у зависности од концентрације, тј. примењене оралне дозе. Замена аминокиселина у овокинину у положају 2-7 резултује појачаном антихипертензивном активношћу, у неким случајевима чак и до сто пута. Из овалбумина су регистрована још два АСЕ-инхибиторна пептида хидролизом пепсином (ОА 183-184) и хидролизом трипсином (ОА 200-218). Одређивањем АСЕ-инхибиторне активности пептида насталих ензимском хидролизом куваног беланцета, углавном пептида пореклом из овалбумина, изолована су два нова

пептида са овим својством, секвенци Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu и Tyr-Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu.<sup>8</sup> Осим наведених, из хидролизата протеинских фракција беланцета изоловани су и други пептиди са антихипертензивном активношћу и то:

- Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu, Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe, Phe-Gly, Arg-Cys-Val-Ser-Phe, Glu-Arg-Lys-Ile-Lys-Val-Tyr-Leu, Phe-Phe-Gly-Arg-Cys-Val-Ser-Phe, Leu-Trp, Phe-Cys-Phe, Asn-Ile-Phe-Tyr-Cys-Pro из овалбумина и

- Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu, Tyr-Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu, Ile-Val-Phe, Arg-Ala-Asp-His-Pro из нативног беланцета.<sup>75</sup>

### ***АНТИОКСИДАТИВНА АКТИВНОСТ***

Претходно је већ било речи о утицају реактивних кисеоничних група и слободних радикала на оксидативна оштећења ДНК, протеина и других макромолекула као што су липиди. Овом приликом важно је још једном истаћи уску повезаност између реактивних кисеоничних врста, слободних радикала и дегенеративних обољења која укључују дијабетес, канцер и кардиоваскуларне болести. Из наведеног, произилази да биолошки активни пептиди који се користе у терапеутске сврхе било у облику фармцеутика или у облику суплемената функционалне хране, треба да поседују и одређен ниво антиоксидативне заштите ћелија од оштећења.

Ензимском хидролизом термички обрађеног беланцета применом пепсина настају пептиди са јаком антиоксидативном активношћу. На пример, пептид Tyr-Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu, показује и изразиту АСЕ-инхибиторну активност, али и велику способност за „хватање“ слободних радикала, тј. антиоксидативно својство. Овиме се указује на чињеницу да би ови пептиди са више биолошких функција могли бити важни у контроли кардиоваскуларних обољења, нарочито хипертензије.<sup>23</sup>

## 4. ЕНЗИМСКА ХИДРОЛИЗА ПРОТЕИНА

Интензиван развој прехранбене индустрије, пре свега биотехнологије, допринео је повећању броја висококвалитетних протеинских производа. Поступком ензимске хидролизе, протеини хране могу се искористити за добијање производа побољшаних нутритивних, функционалних и биолошких својстава. Добијени протенски хидролизати могу се користити као додаци функционалне хране и/или суплементи фармацеутика и нутрацеутика, као и за изоловање пептида тачно дефинисане биолошке функције, који се могу инкорпорирати у одговарајуће биолошке лекове. У поређењу са нативним протеинима, протеински хидролизати су сварљивији због мање молекулске масе, мање вискозни, поседују смањену алергеност и повећане биолошке активности.<sup>76</sup>

### 4.1. ТЕОРИЈСКЕ ОСНОВЕ ЕНЗИМСКЕ ХИДРОЛИЗЕ ПРОТЕИНА

Хидролиза протеина представља раскидање пептидне везе, при чему се осолобаћају краћи или дужи пептидни ланци и/или аминокиселине. Овим поступком протеин губи своју нативну структуру и развија се из кватернарне структуре реверзибилно или иреверзибилно. **Ензимска хидролиза** је биотехнолошки поступак који се одиграва деловањем биокатализатора, при чему биокатализатор делује активним центром ослобађајући карбонилну групу до аминокиселине уз издвајање воде. Овим процесом природни полимерни протеини се разлажу на мономерне, а ензим остаје непромењен.<sup>77</sup>

За разлику од хемијски катализоване хидролизе, ензимска хидролиза се изводи при благим реакционим условима, лако се контролише и омогућава добијање необојених производа бољег квалитета, жељених функционалних и биолошких својстава и у већем приносу, са знатно мањим загађењем животне средине. Такође, ензимска хидролиза доводи до промене величине молекула и степена хидрофобности протеина, као и до промене поларности, повећања садржаја јонизујућих група ( $\text{NH}_3^+$  и  $\text{COO}^-$ ) што директно утиче на функционалне особине добијених хидролизата. Опрема која се користи приликом ензимске хидролизе знатно је јефтинија, трошкови за енергију су мањи и не долази до деградације производа. Ензимске технологије се такође сматрају „зеленим технологијама”. За разлику од органских катализатора, ензими поседују способност разликовања група у

молекулу и енантиомерних супстанци што их чини региоспецифичним и стереоспецифичним, редом.<sup>76,78</sup>

За производњу протеинских хидролизата тачно дефинисаних својстава и карактеристика, ензимским поступком, неопходно је познавати механизам ензимске реакције. Реакције ензимске хидролизе протеина катализоване протеазама могу се дефинисати помоћу три узастопне реакције:<sup>79</sup>

1. формирање комплекса између нативног пептида и ензима, познатог као Михаелисов комплекс,
2. хидролиза пептидне везе приликом које се ослабађа један или два пептида и
3. нуклеофилни напад на остатак Михаелисовог комплекса у циљу ослобађања других пептида и реконституције слободног ензима.

Уопштено прихваћен механизам ензимске хидролизе протеина заснива се на чињеници да је дисоцијација Михаелисовог комплекса, на слободан ензим и производ реакције, ступањ који контролише укупну брзину реакције хидролизе.<sup>78</sup> На профил пептида добијених хидролизата и брзину реакције, поред специфичности ензима, као битни фактори издвајају се температура и рН. Екстремно висока температура и рН доводе до денатурације, а последично и до дезактивације ензима.<sup>80</sup>

Протеински хидролизати приликом инкорпорирања у прехранбене формулације налазе на мањи отпор од стране произвођача услед горког укуса хидролизата и/или одсуства ароме. Код већине протеинских хидролизата, горчина је последица присуства хидрофобних аминокиселинских остатака у секвенци пептида малих молекулских маса, као што су: Val, Ile, Phe, Trp, Leu и Tyr.<sup>81</sup> Истраживања показују да се уклањање ових аминокиселина може извршити на неколико начина који укључују: 1) селективно пречишћавање применом јоноизмењивачке хроматографије и/или адсорпцијом коришћењем активног угља и  $\beta$ -циклодекстрана, 2) маркирање места у секвенци, 3) различите методе екстракције и 4) ензимски третман тј. хидролиза коришћењем егзо-пептидаза.<sup>82</sup> Најзначајније егзо-пептидазе које су испољиле високу ефикасност са аспекта смањења горчине хидролизата су: егзо-пептидаза из *Aspergillus oryzae*, аминокиселин-пептидаза из *Streptococcus lactis* (данас *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*) и *Thermus aquaticus* YГ-1, кароксипептидаза, као и пептидаза из *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11.<sup>81,83</sup>

Основни параметар којим се прати ток ензимске хидролизе протеина, а којим се уједно и квантитативно описује величина насталих ди-, три- и олигопептида јесте

степен хидролизе. **Степен хидролизе** (на енгл. degree of hydrolysis - **DH**) дефинише се као однос броја раскинутих пептидних веза и укупног броја пептидних веза присутних у молекулу нативног протеина.<sup>78, 84</sup>

$$DH (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \cdot 100 \quad (3.1)$$

где је  $h$  број еквивалентних пептидних веза хидролизованых у тренутку  $t$ , а  $h_{tot}$  укупан број пептидних веза у протеинском супстрату.

На основу тренутних литературних сазнања, неколико метода се врло учестало користи за квантификавање степена хидролизе током ензимске хидролизе протеина изведене у шаржном реакторском систему. Оне укључују добро познату рН-стат методу,<sup>78</sup> квантификацију ослобођених аминок група коришћењем 2,4,6-тринитробензен 1-сулфонске киселине (TNBS киселина),<sup>85-86</sup> као и спектрофотометријским методама са *o*-фталалдехидом (OPA реагенс)<sup>87</sup> и нинхидринским реагенсом.<sup>88</sup> Наведене методе имају и своје предности и своје недостатке, сумиране у Табели 4.1, али се у лабораторијским истраживањима далеко више користи рН-стат метода.<sup>84, 89-91</sup> Литературни подаци наводе да је рН-стат титрација најчешће коришћена метода праћења тока реакције хидролизе протеина, па се јавља и као високо комплементарни приступ експериментима који имитирају дигестију протеина *in vitro*. При адекватним реакционом рН, хидролизом протеина долази до отпуштања или потрошње протона. Услед тога, аутоматским довањем раствора базе и/или киселине жењени рН се одржава константним, те је утрошак средства за титрацију пропорционалан брзини реакције хидролизе протеина.<sup>89</sup> На Слици 4.1 приказана је реакција хидролизе протеина и шематски је илустрован принцип рН-стат титрационе методе при рН вредностима:  $pH \geq 7$  и  $pH \leq 5$ .

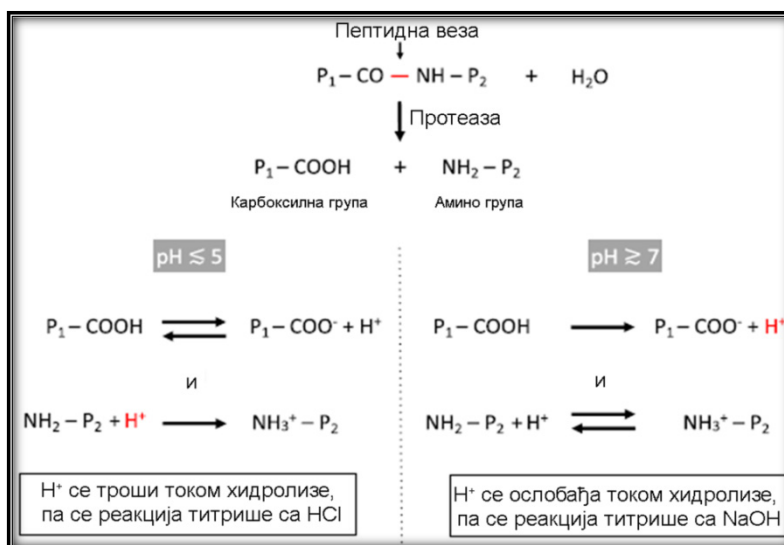
**Табела 4.1.** Основне предности и недостаци метода за квантификавање степена хидролизе протеина.<sup>90-92</sup>

Метод	Предности	Недостаци
рН-стат	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Праћење тока реакције, тј, степена хидролизе у реалном времену;</li> <li>- Не доводи до денатурације протеина и/или дезактивације ензима;</li> <li>- Брза метода;</li> <li>- Заснива се на мерењу протона ослобођених током реакције.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Прецизност приликом одређивања зависности врсте протеазе</li> <li>- Егзо-пептидазе показују лошију процену степена хидролизе</li> <li>- Однос потрошње базе и оствареног степена хидролизе зависи од врсте протеина;</li> <li>- Већа прецизност при раду у алкалној реакционој средини.</li> </ul>



Табела 4.1. Наставак

<p><b>TNBS</b></p>	<p>- Тачна и прецизна метода. - Користи код протеинских хидролизата добијених при алкалним реакционим условима због релативно високе растворљивости протеина, и еквивалентног рН (око 8,2) са рН хидролизе..</p>	<p>- Немогућност праћења тока реакције у реалном времену; - Велика непрецизност код нерастворљивих узорака и узорака богатих пролином: - TNBS је токсично једињење; - Спора дериватизација ослобођених амино група.</p>
<p><b>ОРА</b></p>	<p>- Брза дериватизација ослобођених амино група; - Могуће је праћење тока реакције у реалном времену.</p>	<p>- Велика непрецизност код узорака богатих пролином и/или цистеином, као и нерастворљивих узорака.</p>
<p><b>Нинхидринска</b></p>	<p>- Брза дериватизација ослобођених амино група; - Врло прецизна метода, нарочито погодна за протеини богате пролином.</p>	<p>- Теже одређивање садржаја ослобођених амино група због ниске растворљивости протеина и њихових полипептида у опсегу рН 4,5-5,0 који се обично користи приликом овог теста.</p>



Слика 4.1. Шематски приказ хидролизе протеина ензимским поступком, као и принцип рН-стаг методе на рН ≥ 7 и рН ≤ 5.<sup>89</sup>

#### 4.1.1. Једностепенa и двостепенa ензимска хидролиза протеина беланцета

Биотехнолошки поступак хидролизе протеина зависи од великог броја оперативних фактора, а прегледом научне литературе утврђено је да га је могуће извести као:

- ❖ **једноступену ензимску хидролизу**, која се заснива на истовременом дејству протеаза са ендo-пептидазном активношћу и различитом специфичношћу;

- ❖ **двостепену ензимску хидролизу**, код које се прво на супстрат протеина делује парцијално ендо-пептидазама широког спектра деловања, а затим значајно специфичнијим ендо- и екзо-пептидазама.<sup>93</sup>

Како употреба протеолитичких ензима често доводи до повећања трошкова биотехнолошког процеса, прибегава се употреби јефтиних сировина и протеинских супстрата, а да би се обезбедила максимална биолошка активност хидролизата веома је важан правилан избор ензима и/или комбинације више ензима.<sup>94</sup>

Студије су показале да је производња биолошки активних пептида у облику хидролизата и/или фракција пептида протеина беланцета, пре свега изолованих протеинских фракција, најчешће извођена једностепеним ензимским поступцима. Тако су за производњу пептида са АСЕ-инхибиторном активношћу из комерцијалног овалбумина, у једностепеном шаржном реакторском систему, истраживачи издвојили пепсин као ензим са највећим афинитетом према овалбумину у поређењу са трипсином и химотрипсином.<sup>95</sup> Идентично је потврђено и хидролизом протеина сировог беланцета.<sup>60</sup> Термички претретирани протеини беланцета подвргнути су хидролизи ендо-пептидазом алкалазом, а из добијеног хидролизата изоловане су фракције пептида са антидијабетским својствима, односно са  $\alpha$ -глукозидаза и  $\alpha$ -амилаза инхибиторним активностима.<sup>96</sup> Антиоксидативна способност хидролизата протеина беланцета добијеног једностепеним ензимским поступком хидролизе са папином значајно је повишена повећањем концентрације полазног супстрата и смањењем алкалне рН, али промена рН није имала утицаја на антихипертензивна својства хидролизата. На овај начин истраживачи су потврдили да и реакциони услови, осим специфичности папаина, утичу на биолошку активност ослобођених пептида у хидролизату.<sup>97</sup> Оптимизацијом једностепеног ензимског поступка хидролизе беланцета алкалазом, Цигић (Cigić) и сарадници су уочили да сувише интензиван термички третман протеина доводи до стварања нерастворних агрегата или филм гелова, од преципитације и на тај начин се спречава приступ ендо-пептидази. При неутралним и киселим рН током преципитације супстрата образују се релативно велике честице које имају мали однос површине и запремине и као такве чине непогодан супстрат за хидролизу. Иако су највећи степен хидролизе и брзине реакције остварене су при температури реакције 60 °С, нутритивна вредност хидролизата била је мала услед хемијских промена аминокиселина и Милардове реакције пептида са угљеним хидратима.<sup>98</sup> Зато,

примењена је двостепена ензимска хидролиза, односно након деловања алкалазе, деловано је егзо-пептидазом флеворизмом на делимично хидролизовано беланце. Увођењем двостепене хидролизе значајно је повећан степен хидролизе у односу на једностепени процес за беланце као извор протеина,<sup>98</sup> али је потврђено и за друге супstrate као што су: изолат протеина сунцокрета,<sup>99</sup> протеини млека,<sup>100-101</sup> протеинска фракција овотранферин<sup>102</sup> и протеини беланцета пачијих јаја.<sup>93</sup>

## 4.2. ПРОТЕОЛИТИЧКИ ЕНЗИМИ

**Протеолитички ензими или протеазе** представљају групу ензима који катализују хидролизу пептидне везе у молекулима протеина и/или пептида услед чега их разлажу на пептиде мање молекулске масе. Реакција хидролизе протеина је реверзибилна, тако да протеазе могу, под одређеним условима, да катализују повратну реакцију синтезе пептида уз издавајуће воде. Према Међународној номенклатури протеазе припадају групи хидролаза, подгрупа 3,4-пептид-хидролазе.<sup>103</sup>

**Класификацију протеолитичких ензима** могуће је извршити на основу више критеријума: позиција пептидне везе у молекулу протеина на коју делују, структура активног центра и механизам деловања, као и рН вредност при којој делују. Протеазе се на основу оптималне рН вредности за активност могу класификовати на **алкалне**, **неутралне** и **киселе**, што је од великог значаја за њихову практичну примену. Алкалне бактеријске протеазе се користе у прозиводњи детергената, а киселе имају већи значај у индустрији сира и фармацеутској индустрији.<sup>77, 103</sup>

На основу позиције пептидне везе у молекулу протеина коју хидролизују протеазе се деле на **егзо-пептидазе** и **ендо-пептидазе** (Табела 4.2). **Егзо-пептидазе** делују на крајевима пептидних ланаца одвајајући постепено поједине аминокиселине или дипептиде и на тај начин прогресивно скраћују пептидне ланце. **Ендо-пептидазе** дејствују у унутрашњости молекула протеина, често на одређеној удаљености од терминалне амино- или карбоксилне групе, и разлажу протеин насумично на пептиде мање молекулске масе. Ендо-пептидазе се међусобно разлику по својој специфичности, тако да одређене хидролизују пептидну везу између било које две аминокиселине, док су друге строго специфичне према одговарајућим аминокиселинама.<sup>104</sup> На основу механизма деловања разликују се четири групе протеолитичких ензима: **серинске**, **цистеинске**, **аспертатне протеазе** и **металопротеазе**.<sup>105</sup>

Табела 4.2. Класификације протеаза.<sup>104, 106</sup>

Протеазе	Место раскидања пептидне везе <sup>a</sup>	Класификациони број (на енгл. enzyme clasification number - ЕС No)
<b>Егзо-пептидазе</b>		
- аминоксептидазе	•↓-○-○-○-○---	3.4.11
-дипептидил пептидаза	••↓-○-○-○---	3.4.14
-трипептидил пептидаза	•••↓-○-○---	3.4.14
- карбоксипептидазе	---○-○-○-○-○↓•	3.4.16-3.4.18
- протеазе серинског типа		3.4.16
- металопротеазе		3.4.17
-протеазе цистеинског типа	---○-○-○-○↓•••	3.4.18
-пептидил депептидаза	•↓•	3.4.15
-дипептидазе	*•↓-○-○---	3.4.13
-омегапептидазе	---○-○-○↓••*	3.4.19
<b>Ендо-пептидазе</b>	----○-○-○↓-○-○-○--	3.4.21-3.4.24
- серинске протеазе	-	3.4.21
- цистеинске протеазе		3.4.22
- аспартатне протеазе		3.4.23
- металопротеазе		3.4.24
- протеазе непознатог каталитичког механизма		3.4.99

<sup>a</sup> Отворени кругови представљају аминокиселинске остатке полипептидних ланаца. Затамњени кругови представљају терминалне аминокиселине, док звездице означавају блокиране крајеве ланаца. Стрелице приказују места у полипептидним ланцима на којима делују специфичне протеазе.

### **СЕРИНСКЕ ПРОТЕАЗЕ**

Серинске протеазе су карактеристичне по свом активном центру у чији састав улази аминокиселина серин. Продукује их велики број микроорганизама углавном екстрацелуларно. Релативно су малих молекулских маса и показују највећу активност при рН 7-11. Ћелије их углавном синтетишу у облику неактивног претходника, проензима или зимогена, који се морају превести у активан облик уклањањем дела пептидног ланца који маскира активни центар ензима. У најважније представнике ове групе ензима сврставају се химотрипсин, трипсин, тромбин, еластаза, субтилизин.<sup>77</sup>

Серинске протеазе садрже више од 1775 аминокиселинских остатака, при чему N-терминални каталитички домени садрже 268-511, а сигнални пептидни ланци 27-280 аминокиселинских остатака. За све серинске протеазе дефинише се језгро структуре сличне самом каталитичком домену.<sup>107-108</sup> Главну улогу у каталитичком механизму серинских протеаза игра „**каталитичка тројка**“ која се састоји од три

есенцијалне аминокиселине: хистидина (His57), серина (Ser195) и аспарагинска киселине (Asp102). Свака од ове три аминокиселине има важну улогу у раскидању пептидних веза. Тако, -ОН група серина се понаша као нуклеофил који напада угљеников атом карбонилне групе која учествује у формирању ковалентне везе између ензима и супстрата, док слободни електронски пар на азотовом атому хистидина има способност да прихвати водоников атом из -ОН групе серина координирајући тако напад на пептидну везу.<sup>108-109</sup>

### ***ЦИСТЕИНСКЕ ПРОТЕАЗЕ***

Цистеинске протеазе веома су распрострањене у природи и карактеришу се активним центром у чији састав улазе остаци две аминокиселине, цистеина и хистидина. Активне постају под утицајем одређених редукционих агенаса као што су аскорбинска киселина, водоник-сулфид, цистеин, глутатион. Највећу активност имају у неутралној средини. Познате су као биљне протеазе, јер су распрострањене у соковима и ткивима биљака. Најважнији представници су папаин, фицин и бромелин.<sup>77</sup> Сви активатори папаина испољавају способност редукције дисулфидних мостова, док једињења која оксидишу сулфхидрилне групе (водоник-пероксид, јод) инхибирају активност папаина. Механизми деловања папаина и серинских протеаза су слични, с том разликом што код папаина долази до стварања тиоацил-ензим комплекса као ковалентног интермедијара. Нуклеофилност SH групе је повећана суседним остатком His159 који уједно игра улогу акцептора протона. Поред SH групе, од есенцијалне важности за активност је и присуство карбоксилне групе у дисосованом облику.<sup>110</sup>

Каталитички механизам хидролизе пептидне везе цистеинским протеазама започиње депротонизацијом тиолне групе активног центра ензима од стране суседне аминокиселине која у бочном ланцу садржи остатак хистидина. Следећа фаза је нуклеофилни напад депротонованог цистеинског анјонског сумпора на карбонилни угљеников атом пептида, при чему долази до ослобађања фрагмента пептида на N-терминалном крају. Истовремено, хистидински остаци протеазе се враћају у свој депротонизовани облик, а тиоестар (настали интермедијар) учествује у везивању за нови C-терминални крај супстрата.<sup>111</sup>

### ***АСПАРТАТНЕ ПРОТЕАЗЕ***

Аспартатне протеазе су група киселих протеаза чији активни центар садржи остатке аспарагинске киселине. Максималну активност показују у киселој средини

при рН вредностима 3-4,5, док већини ових ензима молекулска маса варира од 30 до 45 kDa. Такође, изоелектрична тачка им се налази у киселој средини. Два бочна остатка аспарагинске киселине, некад на различитим субјединицама, учествују у реакционом механизму. Најпознатији представници су пепсин и ренин, дигестивни ензими животоњског порекла. Микробне аспартатне протеазе се производе помоћу *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* и *Mucor* сојева.<sup>77</sup>

Аспартатне протеазе имају способност раскидања пептидних веза са хидрофобним аминокиселинским остацима, као и оних са метиленском групом у  $\beta$ -положају. Током реакције хидролизе ове протеазе не формирају ковалентни интермедијар, као остале протеазе. Велики број различитих каталитичких механизма предложено је за ове протеазе, али је прихваћен кисело-базни механизам који укључује смештање молекула воде између два остатка аспартатне киселине. Један остатак аспарагинске киселине активира воду издвајањем протона, онемогућавајући молекулу воде да нападне карбонилни угљеников атом супстрата који учествује у формирању ковалентне везе, стварајући тетраедарски интермедијар у форми оксианјона. Реорганизација интермедијара доводи до протонизације азота из амида молекула супстрата и ослобађања одговарајуће аминокиселинске секвенце.<sup>112</sup>

### **МЕТАЛОПРОТЕАЗЕ**

Металопротеазе представљају групу протеаза за чију је каталитичку активност од есенцијалне важности присуство двовалентних јона  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  и др. Јони метала могу бити лабаво везани са протеинским делом ензима и лако се од њега могу одвојити, као нпр. код леуцин-аминопептидазе и глицилглицин-дипептидазе. Друга подгрупа ових протеаза садржи у молекулу метал који је чврсто везан са протеинским делом ензима, као на пример код карбоксипептидазе. Велики број металопротеаза максималну активност испољава у неутралној до киселој средини. Агенси који реагују са металима, као што су фенантролин, цитрати, полифосфати, инхибирају металопротеазе. Најпознатији представник је микробни термолизин, термостабилна неутрална протеаза.<sup>77</sup>

#### **4.2.1. Комерцијалне протеазе за хидролизу протеина беланцета**

Прегледом доступне научне литературе уочено је да се за хидролизу протеина најчешће користе комерцијални препарати егзо- и ендопептидаза, као што су протеаза из *Bacillus licheniformis*, протеаза из *Bacillus amyloliquefaciens*, папаин, трипсин,

пепсин, протеаза из *Aspergillus oryzae*, о којима ће бити нешто више речи јер ће користити у овој докторској дисертацији.

**Алкалаза** (на енгл. Alcalase<sup>®</sup> 2,4 L) је име комерцијалне алкалне протеазе изоловане из *B. licheniformis*. Незаштићено име овог ензима је субтилизин, са ознаком ЕС 3.4.21.62. Алкалаза припада групи екстрацелуларних серин-ендопептидаза које нападају пептидну везу нуклеофилним деловањем серинског центра. Активна је на рН између 6,5 и 8,5, са рН оптимумом на 8 и изоелектричном тачком 9,4. Када је у питању температурни оптимум, алкалаза се одлукује највећом активношћу на температурама 55-60 °С. Састоји се од 275 аминокиселинских остатака, а чине је неколико  $\alpha$ -хеликса и многобројне  $\beta$ -наборане плоче.<sup>113</sup> Активни центар субтилизина чине аминикиселине Asp32, His64 и Ser221 које образују каталитичку тријаду. Катализовање хидролизе пептидне везе се састоји из неколико фаза: 1) прво, карбоксилна група Asp32 предаје протон азоту у имидазоловом прстену His64; 2) други атом азота из His64 реагује са хидроксилном групом из Ser221, при чему настаје нуклеофилни кисеоник; 3) нуклеофилни напад депротонованог кисеоника Ser22 на карбонилну групу пептидне везе и формирање тетраедарног интермедијара. У наредном кораку, раскида се пептидна веза и протон са интермедијара се помера ка His64, и настаје стабилан ацил-ензим интермедијар. Молекул воде предаје протон His64, те се негативно наелектрисан кисеоник везују за угљеник из карбонилне групе на C-терминалном крају пептида образујући нови тетраедарни интермедијар. Последња фаза подразумева раскидање везе између Ser221 и карбонилног кисеоника и реаговање протона са азотом из His64. Тако хистидин се стабилизује, а негативно наелектрисан угљеник из карбонилне групе се стабилизује образовањем двогубе везе са кисеоником, док се C-терминални крај пептида уклања.<sup>114-116</sup> Индустијска алкалаза је веома стабилна у органским растварачима и употребљива се за: 1) раскидање N-заштићених аминокиселина у воденом раствору и органском растварачу високе пречишћености, 2) кинетички контролисано формирање пептидних веза у раствору етанола и 3) диастереоселективне хидролизе пептидних естера, у циљу добијања оптички чистих пептиди.<sup>117</sup>

**Флеворзим** (на енгл. Flavourzyme<sup>®</sup> 500 L) представља екстрацелуларну леуцил-аминопептидазу, изоловану из плесни *A. oryzae*, заведена као ЕС 3.4.11.1, која својим активним центром фаворизује хидролизу пептидних веза на N-терминалном крају на местима где се налазе остаци леуцина. Карактерише се ендо- и екзопептидном

активношћу, које се највише испољавају при температурама 45-50 °C и рН 5-7. Своју активност флелворзим испољава у присуству јона метала:  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$   $Mn^{2+}$ . Када је у питању механизам деловања ове протеазе, он још увек није утврђен, мада су истраживачи утврдили механизам деловања леуцил-аминопептидазе из говеђег ткива из *E. coli*.<sup>118-119</sup>

**Неутраза** (на енгл. Neutrase® 0.8 L; EC 3.4.24.28) представља стабилну неспецифичну Zn-ендопептидазу, изоловану из *B. amyloliquefaciens*. Позната је и под називом бацилолизин, због својства лизе бактерија. По карактеристикама, она је неутрална екстрацелурална протеаза, која у свом активном центру садржи Zn. По молекулу протеазе везује се један атом цинка. Поред тога, у структури пречишћене неутразе пронађен је јон калцијума, везан аминокиселинама His392, His396 и Glu416, за који се претпоставља да учествује у стабилизовању структуре спречавајући аутолизу. Међутим, за каталитичку активност неопходан је најмање још један аминокиселински остатак, електрофил, Glu393, док је нуклеофил активиран молекул воде.<sup>120-121</sup> Веома карактеристично за неутразу јесто то да није осетљива на природне инхибиторе протеаза из биљних супстрата, па се често користи у индустрији пива. Такође, карактеристична је висок афинитет према остацима хидрофобних аминокиселина. Истраживачи истичу да највећа предност неутразе лежи у њеној ниској термостабилности што је чини повољном за контролу хидролизе протеина хране са ниским степеном хидролизе.<sup>122</sup>

**Папаин**, изолован из латекса незрелог плода папаје-*Carica papaya*, чини део фамилије цистеинских протеаза (EC 3.4.22.2). Карактеристичан је по својој структури коју чини само један полипептидни ланац у чијем саставу се налазе три дисулфидна моста и једна сулфхидрилна група. Полипептидни ланац састоји се од 212 аминокиселинских остатака. У активном центру, каталитичкој дијади Cys25 и His159, налази се цистеин, који у депротонаном стању нуклеофилно напада карбонилни угљеник пептидне везе одвајајући N-терминални крај. Папаин фаворизује бочне пептидне ланце у положају P2, који се одликују високим садржајем хидрофобних аминокиселинских остатака. Максималну активност папаин испољава при рН вредностима у опсегу 6-7 (током хидролизе за активирања папина неопходно је присуство цистеина или глутатиона; 5-10 mM), док је температурни оптимум 55-65 °C. Тродимензионална структура показала је да молекул папаина чине већи број  $\alpha$ -



хеликса, као последица јаких електростатичких привлачења, и једна антипаралелна  $\beta$ -наборана плоча.<sup>123</sup>

#### 4.2.2. Примена протеолитичких ензима са аспекта унапређења биолошких својстава протеина и/или пептида

За примену протеолитичких ензима у процесима хидролизе протеинских супстрата различитих извора, најважнија и уједно полазна хипотеза о могућој употреби, заснива се на њиховој специфичности према пептидним везама. Из тог разлога, сумарно у Табели 4.3 дат је приказ најкоришћенијих комерцијалних протеаза, груписаних према каталитичком механизму, са акцентом на њихову специфичност.

**Табела 4.3.** Специфичност најзначајнијих протеолитичких ензима.<sup>124</sup>

Протеазе	Извор	Место раскидања пептидне везе
<b>Ендопептидазе</b>		
<i>Серинске протеазе</i> - Трипсин - Химотрипсин - Ентерокиназа - Еластаза - Субтилизин - Протеиназа К  - Тромбин	говеђи серум говеђи серум говеђи серум свињски серум микробни гљивични  говеђи серум	-Arg или Lys↓ неспецифично <sup>a</sup> - -Trp (/Phe, Leu, Tyr)↓ неспецифично- Asp-Asp-Asp-Lys↓ неспецифично- -Ala (/Gly/Val)↓ неспецифично- -Trp (/Tyr, Phe, Leu)↓ неспецифично- -ароматичне, алфатичне/хидрофобне ↓ неспецифично- -Arg (/Lys)↓ неспецифично- специфично -Leu-Val-Pro-Arg-↓ Gly-Ser-
<i>Цистеинске протеазе</i> - Бромелин - Папаин - Фицин	биљни биљни биљни	-неспецифично↓ неспецифично- -Arg (/Lys)↓ неспецифично- -неспецифично↓ неспецифично-
<i>Металопротеазе</i> - Ендопептидаза Asp-N - Термолизин  - Колагеназа - Дисаза	микробни микробни  микробни микробни	-неспецифично↓ Asp- -Leu (/Phe)↓ Leu (/Phe, Val, Met, Ala, Ile)- -Pro-неутрално <sup>a</sup> ↓ Gly-Pro- -неспецифично↓ неполарно <sup>a</sup> -
<i>Аспартатне протеазе</i> - Пепсин  - Катепсин Д	свињски серум  говеђи серум	-Phe (/Tyr, Leu, Trp)↓ Trp (/Phe, Tyr, Leu)- -Phe (/Leu)↓ неспецифично (не Val, Ala)-

Табела 4.3. Наставак

Егзопептидазе		
<i>Серинске протеазе</i> - Карбоксипептидаза Y	квасно	-неспецифично↓неспецифично
<i>Цистеинске протеазе</i> - Катепсин Ц - DAPase	говеђи серум свињски серум	уклања N-терминални дипептид уклања N-терминални дипептид
<i>Металопротеазе</i> - Карбоксипептидаза А - Карбоксипептидаза Б	говеђи серум свињски серум	-неспецифично↓ароматичне или разгранате остатке сецифична за C-терминалне остатке Arg/Lys

*неспецифично*<sup>а</sup> означана неспецифичан аминокиселински остатак у полипептидом ланцу; *неутрално*<sup>б</sup> означана бочни остатак неутралне аминокиселине; *неполарно*<sup>в</sup> означана бочни остатак неполарне аминокиселине; стрелице приказују места у полипептидним ланцима на којима делују специфичне протеазе раздвајајући N- и C-терминалне крајеве.

Хидролиза протеина пронашла је велику примену у најразличитијим биотехнолошким процесима (Слика 4.2). По својој природи прехранбени производи су веома сложени јер су састављени од различитих компонената које чине међусобно другачији конституенти. Међу овим компонентама пептиди и протеини заузимају посебно место, јер доприносе биолошкој, хранљивој и/или технолошко-функционалној вредности хране. Међутим, кључна тачка у проучавању употребе протеолитичких ензима у процесирању хране усмерава се на процењивање безбедност соја који продукује ензим као и безбедност самог ензима. То значи да се примена одговарајуће протеазе у индустријским условима не заснива само са становишта специфичности и/или стабилности ензима. Уверење о безбедној употреби протеазе даје и/или одобрава Заједнички експертски одбор ФАО/СЗО за прехранбене адитиве (*на енгл.* Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives- JECFA).<sup>53</sup>

Данас, употреба дијететских суплемената заснованих на хидролизатима протеина надомешћује унос протеина код пацијената који не могу искористити нативне протеине услед болести, као што је Кронова болест или панкреатитис. Коришћење протеинских хидролизата у спортској исхрани значајно је допринело побољшању опоравка везивног ткива након вежбања. Штавише, ови суплементи испољавају инсулинотропни ефекат, нарочито хидролизати са високом концентрацијом леуцина. Међутим, научне студије указују на потешкоће током дефинисања или изолације реалног узорка који се показао као користан

коришћењем протеинских хидролизата и истичу да би комбинација неколико биолошких својстава била оправдано најприхваћенија, с обзиром да би пептиди са већем бројом биолошких активности могли да утичу на нутритивне ефекте.<sup>106</sup>

Са посматраног становишта, протеазе у индустријској пракси значајно доприносе проширењу палете нових дијететских супрелемана, па су истраживања са аспекта побољшања стабилности протеаза (нпр. методе имобилизације протеаза), унапређивања њихове активности, али и продуктивности процеса хидролизе увођењем различитих третмана протеина са циљем денатурације инхибитора протеаза, од велике важности. Пепсин, химотрипсин и трипсин најкоришћеније су протеазе у научним студијама, с обзиром да могу симулирати гастроинтестиналну дигестију протеина који се иначе користе у исхрани. Међутим, остали ензими, као што су алкалаза и термолизин, врло учестало се користе у проучавању и унапређивању поступка производње биоактивних пептида.<sup>125</sup>



Слика 4.2. Шематски приказ примене протеолитичких ензима у области биотехнологије.<sup>53</sup>

### 4.3. КИНЕТИКА ЕНЗИМСКЕ ХИДРОЛИЗЕ ПРОТЕИНА

**Ензимска кинетика** се бави утицајем различитих оперативних фактора: концентрације ензима, концентрације супстрата и производа, рН, температуре итд., на брзину ензимске реакције. Основни задатак кинетичке анализе своди се на одређивање закона брзине ензимске реакције у циљу израчунавања времена одигравања и приноса реакције, што је полазна основа за добијање пројектних једначина неопходних за пројектовање ензимских реактора и оптимизацију процеса. **Ензимска хидролиза протеина** из природних извора представља, на молекуларном нивоу, сложену реакцију како због специфичности деловања протеаза, тако и због самог састава супстрата, различите доступности веза за напад ензима, што углавном зависи од концентрације протеина у супстрату. За моделовање реакције хидролизе протеина, научне студије најчешће препоручују коришћење емпиријских модела. Тако, прегледом доступне научне литературе уочава се различит приступ самом поступку хидролизе протеина, те и једначина које се користе за описивање брзине реакције хидролизе.

Истраживачи у својим студијама претпостављају да ензимска хидролиза прати Михаелис-Ментенову кинетику. Ричардс (Richards),<sup>126</sup> Отсен (Ottesen),<sup>127</sup> Биску (Biszkü) и сарадници,<sup>128</sup> Демирхан (Demirhan) и сарадници<sup>129</sup> описали су ензимску хидролизу пептидних веза у молекулима протеина Михаелис-Ментеновом једначином праћену кинетиком реакције првог реда. Кинетика првог реда последица је механизма којим степен хидролизе контролише ступањ у коме се услед хидролизе нарушава терцијарна структура протеина.<sup>113, 130</sup> Проучавањем кинетике хидролизе протеина соје, Гонзалес-Тело (González-Tello) и коаутори су истакли да је важна и да се мора узети у обзир конкуренција између полазног нехидролизованог супстрата и пептида који се константно ослобађају, јер може довести до смањења степена хидролизе и дезактивације ензима. Узимајући наведено у обзир, механизам хидролизе протеина соје описан је кинетиком нултог реда, а дезактивација ензима кинетиком другог реда.<sup>131</sup> Изведен је закључак да током времена степен хидролизе опада и достиже одређену лимитирану вредност, али и да се повећањем концентрације протеазе повећава, те да је реакција бржа. Супротно, повећањем концентрације нехидролизованог супстрата смањује се степен хидролизе. До смањења степена хидролизе може доћи услед: 1) смањења концентрације пептидних везе у супстрату

доступних за хидролизу, 2) инхибиције ензима производима хидролизе и 3) денатурације протеаза. Негативан утицај повећања концентрације супстрата указује на то супстрат има важну улогу у дезактивацији ензима, те да концентрација хидролизованых пептидних веза није фактор који контролише степен хидролизе.<sup>131</sup>

Утврђивањем механизма и кинетичког модела реакције хидролизе говеђег серума албумина трипсином, узимајући у обзир инактивацију ензима и инхибицију супстратом у вишку или производом, изведен је реакциони механизам на основу Михаелис-Ментенове једначине за добијене експерименталне резултате при различитим оперативним условима. Наиме, у овом истраживању настављен је рад Гонзалес-Тело (González-Tello) и коаутора, а њихов кинетички модел је допуњен. Конкретно, експоненцијална емпиријска једначина којом се описује хидролиза протеина остала је иста  $dx/dt = a \cdot \exp(-bt)$ , али параметри  $a$  и  $b$  имају различите изразе због различитих реакционих механизма, као и различите вредности за различите реакционе системе (Табела 4.4).<sup>132</sup>

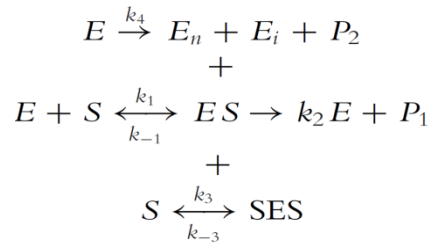
**Табела 4.4.** Изрази кинетичких параметара  $a$  и  $b$ .<sup>132</sup>

Реакциони механизам	Параметар $a$	Параметар $b$
<i>Без инхибиције</i>	$\frac{k_2 e_0}{s_0}$	$\frac{k_3 K_m}{k_2}$
<i>Инхибиција супстратом</i>	$\frac{k_2 K_s e_0}{s_0 K_s + s_0^2}$	$\frac{k_3 K_m K_s}{k_2 (K_s + s_0)}$
<i>Инхибиција производом</i>	$\frac{k_2 K_p e_0}{s_0 K_p + p K_m}$	$\frac{k_3 K_m K_p s_0}{k_2 (p K_m + s_0 K_p)}$
<i>Инхибиција супстратом и производом реакције</i>	$\frac{k_2 K_s K_p e_0}{s_0 K_s K_p + K_p s_0^2 + K_m K_s p}$	$\frac{k_3 K_m K_s K_p}{k_2 (p K_m K_s + s_0 K_p K_s + K_p s_0^2)}$

#### 4.3.1. Емпиријски кинетички модел хидролизе протеина беланцета

Иако је ензимска хидролиза протеина беланцета сложен процес због специфичности протеаза и разноликости протеина који улазе у састав беланцета као супстрата, односно пептидних фрагмената који су производи и уједно реактанти у следећем кораку хидролизе, у пракси је често довољно користити описни математички модел, који доводи до најпоузданије интерполације експерименталних података.<sup>132-133</sup> Тако, да би се тумачили и анализирали експериментални резултати истраживања у оквиру ове докторске дисертације, употребиће се полу-емпиријски

кинетички модел који узима у обзир инхибицију супстратом и дезактивацију ензима, чија је емпиријска једначина експоненцијална функција  $dx/dt = a \cdot \exp(-bb)$ . Конкретно, овај емпиријски кинетички модел претпоставља да је реакција хидролизе протеина беланцета нултог реда и узима у обзир инхибицију супстратом у вишку, као и денатурацију ензима услед напада слободног ензима на ензим-супстрат комплекс у складу са реакцијом другог реда. У овом случају, реакциони механизам могуће је представити на следећи начин:



где су  $E$  и  $S$  слободни ензим и супстрат, редом,  $ES$  и  $SES$  су интермедијарни ензим-супстрат комплекси,  $E_n$  и  $E_i$  су нативна (активна) и инактивна форма ензима, редом,  $P_1$  и  $P_2$  су крајњи производи ензимске реакције и  $k_1, k_{-1}, k_2, k_3, k_{-3}, k_4$  су константе брзина сваког ступња реакције.

У складу са приказаним реакционим механизмом јасно је да неповратна реакција контролише реакцију хидролизе и да брзина реакције зависи од овог ступња, па се може приказати следећом једначином:<sup>132-133</sup>

$$r = S_0 \frac{dx}{dt} = k_2 [ES] \quad (4.1)$$

Брзина ступња у коме долази до дезактивације ензима представља се једначином (4.2)

$$-\frac{de}{dt} = k_4 [E][ES] \quad (4.2)$$

па се комбиновањем (4.1 и 4.2) брзина своди на:

$$-\frac{dx}{de} = \frac{k_2}{k_4 S_0 [E]} \quad (4.3)$$

У реакцији хидролизе ензим је присутан као слободан и у облику интермедијарних комплекса, због чега се укупна концентрација ензима изражава као:

$$e = [E] + [ES] + [SES] \quad (4.4)$$

Под претпоставком да при хидролизе протеина беланцета долази до успостављања равнотежног стања, могу се извести масени биланси за  $ES$  и  $SES$  комплексе:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E][S] + k_{-3} [SES] - (k_{-1} + k_2 + k_3) [S][ES] \approx 0 \quad (4.5)$$

$$\frac{d[SES]}{dt} = k_3[E][ES] + k_{-3}[SES] \approx 0 \quad (4.6)$$

Комбиновањем претходне две једначине, добијају се изрази преко којих се израчунава концентрација  $ES$  и  $SES$  комплекса:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \quad (4.7)$$

$$[SES] = \frac{[E][S]^2}{K_m K_I} \quad (4.8)$$

у којима фигуришу Михаелис-Ментенова константа,  $K_m$  и константа инхибиције супстрата,  $K_I$ , изражене преко брзина реакција једначинама (4.9) и (4.10):

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (4.9)$$

$$K_I = \frac{k_{-3}}{k_3} \quad (4.10)$$

Уз претпоставку да је укупна концентрација супстрата у систему приближно једнака почетној концентрацији супстрата ( $[S] \approx S_0$ ), концентрација слободног ензима добија се сменом једначина (4.7) и (4.8) у једначину (4.4):

$$[E] = \frac{K_m e}{K_m + S_0 + S_0^2/K_I} \quad (4.11)$$

Када је присутна инхибиција супстрата и када управо овај ступањ контролише брзину реакције, афинитет ензима према супстрату је мали,  $K_m \leq S_0 + S_0^2/K_I$ , па се количина слободног ензима може изразити као:

$$[E] = \frac{K_m K_I e}{K_I S_0 + S_0^2} \quad (4.12)$$

Следствено, концентрација ензим-супстрат компелкса из једначине (4.7) сада је:

$$[ES] = \frac{K_I e}{K_I + S_0} \quad (4.13)$$

Сменом једначина (4.8), (4.12) и (4.13) у једначину (4.4) добија се израз за количину слободног ензима, чијом се сменом у једначину (4.3) и интеграљењем у границама  $x$ : 0 до  $x$  и  $e$ :  $e_0$  до  $e$  добија коначни израз за укупну концентрацију ензима:

$$e = e_0 \exp\left(-\frac{k_4 K_m K_I S_0}{k_2 (K_I S_0 + S_0^2)} x\right) \quad (4.14)$$

Коначно, из једначина (4.1), (4.13) и (4.14) добија се израз за брзину реакције хидролизе протеина:

$$r = k_2 \frac{K_I S_0}{K_I S_0 + S_0^2} e_0 \exp\left(-\frac{k_4 K_m K_I}{k_2 (K_I + S_0)} x\right) \quad (4.15)$$

у којем су садржани параметри  $a$  и  $b$

$$a = \frac{k_2 K_I e_0}{K_I S_0 + S_0^2} \quad (4.16)$$

$$b = \frac{k_4 K_m K_I}{k_2 (K_I + S_0)} \quad (4.17)$$

На основу добијених вредност параметри  $a$  и  $b$  даље се израчунавају кинетичке константне на основу којих се даље могу оптимизовати параметри за дизајн биореактора и индустријску производњу пептида. Осим утицаја концентрације супстрата и концентрације ензима, неизоставно је анализирање и утицај температуре на брзину реакције који се може посматрати кроз вредности израчунатих параметара  $a$  и  $b$ . Најпре, зависност константне брзине ензимске реакције,  $k_2$ , од температуре може се описати Аренијусовом једначином:

$$k_2 = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (4.18)$$

у којој је  $A$  предескпоненцијални фактор (1/min),  $T$  је апсолутна температура (K),  $R$  је универзална гасна константа (8,314 J/molK) и  $E_a$  је енергија активације реакције хидролизе (kJ/mol). Промене параметара  $a$  и  $a \cdot b$  узроковане температуром следе Аренијусову једначину и изражавају се као:

$$\ln a = -\frac{E_a}{RT} + A_a \quad (4.19)$$

$$\ln(a \cdot b) = -\frac{E_d}{RT} + A_d \quad (4.20)$$

где су  $E_a$  и  $E_d$  енергија активације реакције хидролизе и енергиза дезактивације ензима (kJ/mol), редом, док су  $A_a$  and  $A_d$  одговарајући фактори.

Промена енталпије ( $\Delta H$ ), ентропије ( $\Delta S$ ) и слободне Гибсове енергије ( $\Delta G$ ) ензимске хидролизе протеина може се израчунати на основу следећих једначина:

$$\Delta H = E_a - RT \quad (4.21)$$

$$\ln \frac{k_2}{T} = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \left( \ln \frac{k_b}{h_p} + \frac{\Delta S}{R} \right) \quad (4.22)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4.23)$$

где је  $T$  апсолутна температура изражена у Келвинима,  $k_b$  Болцманова константна и  $h_p$  Планкова константа.<sup>134</sup>

#### 4.4. УЛТРАЗВУЧНИ ПРЕТРЕТМАН ПРОТЕИНА

Како је припрема високонутритивних протеинских хидролизата врло често ограничена у погледу смањене доступности пептидних веза у унутрашњости молекула протеина дејству протеаза, као и присуства различитих инхибитора протеаза, стога и малих оставрених степена хидролизе, научна истраживања последњих деценија усмерена су пре свега на увођење различитих иновативних



неинвазивних третмана протеина. Конкретно, реч је о примени технологија ултразвука, високог притиска и микроталаса као третмана протеина непосредно пре и/или у току ензимске хидролизе. Поред тога, захтеви прехранбене индустрије са аспекта минималног процесирања прехранбених протеина и/или хране и замене досадашњег конвенционалног третмана високом температуром, који значајно утиче на смањење нутритивних и органолептичких својстава крајњих производа, су све већи. Зато, основни циљ који је постављен приликом увођења иновативних третмана јесте задржавање хранљиве/нутритивне вредности и очување сензорних својстава крајњих производа.

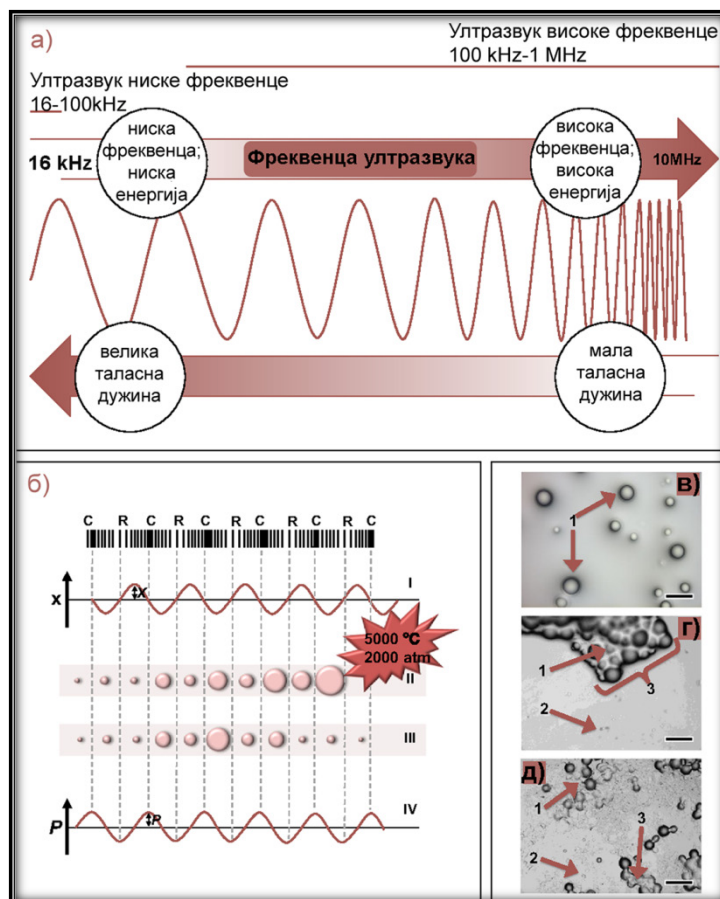
Као једна од најефикаснијих и исплативијих примена технологије ултразвука у прехранбеној индустрији истучу се најразличитији поступци екстракције, али свакако треба истаћи и остале технолошке поступке, као што су кристализација, сушење, емулзификација-хомогенозација и стерилизација. У било ком наведеном технолошком поступку, принцип примене и увођења ултразвука као додатне фазе технолошког процеса базира се на чињеници да ултразвучним третманом долази до хемијских, физичких и физичко-хемијских промена компонената хране.<sup>135</sup>

#### 4.4.1. Механизам деловања ултразвучних таласа

Ултразвучна технологија базира се на примени ултразвучних механичких таласа фреквенце изнад прага људског слуха ( $>16$  kHz). Ови таласи крећу се брзином која је карактеристична за природу таласа и средине, тј. врсте материјала кроз који се таласи преносе. Ултразвук се може класификовати у две категорије: **ултразвук високе фреквенце (100 kHz-1 MHz)** и **ултразвук ниске фреквенце (16-100 kHz)**. Ултразвук високе фреквенце карактерише се ниском амплитудом и ниском снагом односно интензитетом (обично  $<1$  W/cm<sup>2</sup>) чија примена у прехранбеној технологији укључује недеструктивну анализу која се односи на процену квалитета производа. Висока амплитуда и висока снага односно интензитет (у опсегу 10-1000 W/cm<sup>2</sup>) карактеристични су за ултразвук ниске фреквенце, који има латентан ефекат на микроорганизме и интензивно се користи као третман приликом чувања хране, али и за промену физичких или хемијских својстава хране. Ултразвук ниске фреквенце обично се назива „снажан ултразвук“, јер доводи до кавитације и побољшаног преноса масе, а његово коришћење се показало као повољна метода за обраду прехранбених производа, уштеду енергије и очување квалитета производа.<sup>135-136</sup>

Сваки ултразвучни уређај, било у облику сонде или купатила, садржи трансдуктор којим се врши претварање енергије из једног облика у други и производе се таласи. Проласком ултразвучног таласа кроз течни реакциони медијум јавља се акустични притисак, поред већ постојећег хидростатичког притиска, описан синусоидалном функцијом. При ниском интензитету ултразвука, талас изазван тзв. негативним акустичним притиском доводи до кретања и мешања унутар медијума, док се при високим интензитетима, ултразвучни талас простире кроз течни медијум стварајући наизменичну компресију и експанзију циклуса.<sup>137</sup> Ултразвучни талас генерисан ултразвучном сондом високе снаге, при преносу енергије кроз медијум изазива екстремно јаке промене притиска које доводе до формирања мехурова са способношћу да брзо расту (тзв. кавитети) и да се шире или смањују услед флукуација притиска доводећи до повећања температуре (5000 К), притиска (100 МПа) и смицајних сила у реакционом медијуму. Истовремено, услед негативног притиска долази до промена које узрокују формирање малих мехура. Током целокупног ултразвучног третмана у реакционом медијуму се наизменично смењују компресија и експанзија, па већ у следећој фази ултразвучног третмана долази до спајања мехура и повећања њихове величине (Слика 4.3). Након одређеног броја учесталих понављања, мехурови достижу критичну величину унутар које енергија ултразвука није у стању да задржи гасну фазу унутар мехура, па долази до кондензације и имплозије мехурића. Објашњен феномен познат је под називом **кавитација**, док се за ултразвучни третман у овом случају врло често користи термин **соникација**.<sup>14, 137-138</sup>

Ефикасност кавитације зависи од физичких својстава третираног медијума, али превасходно од фреквенце и интензитета ултразвучних таласа, тако да услед повећања фреквенце долази до стварања већег броја кавитационих мехурова мањих величина, па је последично количина ослобођење енергије током имплозије минимална. Образовање мехурова сложеније је у медијумима велике густине, вискозности и површинског напона, тако да су флуиди са високим напоном паре, малом вискозношћу и малим површинским напоном склонији формирању кавитета. Главни механизми формирања кавитације мехурова током соникације приказани су на Слици 4.4.<sup>14, 137-138</sup>



**Слика 4.3.** Подела ултразвука (а); утицај ултразвука на формирање и величину кавитационих мехура (б); честице сахарозе без ултразвучног деловања (в); ултразвук амплитуде 20% (г) и амплитуде 80% (д). *Легенда:* 1-нативне честице; 2-разорене честице; 3-агрегиране честице.<sup>139</sup>



**Слика 4.4.** Шематски приказ главних механизма кавитације мехура.<sup>140</sup>

Истраживања показују да имплозија кавитационих мехура утиче на бројне физичке, механичке и хемијске ефекте услед стварања зона са великом турбуленцијом, али и због велике брзине међучестичних судара. Физичке ефекте

сачињавају микрострујање, формирање микро-џетова (*на енгл. micro-jet*) и ударни таласи, унутар којих је струјање турбулентно, а кавитациони мехури доводе до стварања градијента брзине у микро размерама. Последице, зоне са великом турбуленцијом доводе до повећање преноса масе и топлоте чиме се поспешују процеси екстракције, десорпције и мешања.<sup>141</sup> Испитивањем утицаја фракценце ултразвука на величину кавитационих мехура установљено је да важи обрнута пропорционалност, тј. да ултразвук високе јачине (ниске фреквенце) индукује стварање кавитационих мехура већих пречника. Повећањем фреквенце ултразвука зона кавитације се смањује, температура и притисак у кавитационој зони су нижи, тако да не долази до имплозије мехура, тј. феномен кавитације изостаје.<sup>142</sup>

Када су у питању хемијски ефекти кавитације као најзначајни издаваја се образовање слободних радикалских врста, депротонаног атома водоника,  $\text{H}^\bullet$  и хидроксил радикала,  $\text{OH}^\bullet$ . Формирање хидроксил радикала из којег се образује пероксил радикал може чак и негативно утицати на квалитет појединих компонената хране, као што су незасићене масне киселине. Међутим, научне студије ипак потврђују побољшање функционалности компонената хране у присуство слободних радикала образованих током кавитације, као што је случај нпр. у поступку старења вина.<sup>143</sup>

#### 4.4.2. Примена ултразвука у производњи и детекцији биоактивних пептида

Утицају ултразвучних таласа на саму структуру протеина, њихова најважнија технолошко-функционална својства која су од значаја за нутритивну и функционалну вредност крајњег производа у прехранбеној индустрији, посвећено је доста пажње у научним истраживањима.<sup>144-145</sup> У том контексту, овде ће само бити речи о директном утицају кавитације на структуру протеина, са аспекта нарушавања хемијских веза које чине структуру протеина стабилном.

Када је у питању примарна структура протеина, ултразвучни таласи, било високе или ниске фреквенце, не узрокују промене у полипептидним ланцима који сачињавају  $\alpha$ -хеликсе и  $\beta$ -наборане плоче. Наиме, енергија ултразвучних таласа није довољна за раскидање пептидне везе, а самим тим и промене аминокиселинске секвенце протеина. Истраживања су ово доказала на већем броју протеина различитог порекла, као што су: изолат протеина соје,<sup>146</sup> протеини беланцета оворотрансферин<sup>147</sup> и овалбумин,<sup>148</sup> беланце,<sup>149</sup>  $\alpha$ -лакталбумин и  $\beta$ -лактоглобулин,<sup>150</sup>

протеини кукурузног глутена,<sup>151</sup>  $\beta$ -конглицини и глицинин,<sup>152</sup> протеини млека<sup>153</sup> и други протеини биљног и животињског порекла.<sup>154</sup> Наведене студије потврдиле су да ултразвучни таласи омогућавају промену кватернарне стуктуре протеина раскидањем водоничних, нековалентних, дисулфидних веза, и других интрамолекулских веза. Тиме ултразвучни третмани протеина значајно доприносе побољшању функционалности, али оно што је најважније омогућавају регруписивање полипептидних ланаца у молекулима чинећи их на тај начин конформацино доступнијим молекулима протеолитичких ензима, што посредно значајно доприноси испољавању биолошких активности пептида.<sup>153-154</sup> У супротности од наведених резултата издваја се неколико научних истраживања у којима је након ултразвучног третирања протеина дошло до мањих промена у молекулским масама протеинских субјединица  $\alpha$ -лакталбумина<sup>155</sup> и протеина сурутке.<sup>16</sup>

Разградња нативних протеина је важан корак у идентификацији, карактеризацији, квантификацији и производњи биолошки активних пептида (област протеомике), и уобичајно се врши протеолитичком или киселинском хидролизом у раствору (преко ноћи) и/или у гелу (24-72 часа). Традиционалне методе припреме пептида захтевају дуготрајну припрему узорака, те је поступак хидролизе протеина једна од главних технолошких фаза. Међутим, поступак хидролизе не гарантује сваки пут репродуктивност услед хетерогеног састава протеина, чиме је производња пептида отежана.<sup>156</sup> Као што је већ напоменуто, ради убрзавања поступка хидролизе и постизања већих приноса реакције, научна литература даје преглед различитих иновативних технологија које се између осталог заснивају и на примени ултразвука високог интензитета са кавитационим ефектом. У том погледу истиче се да је ултразвук брза, једноставна и веома ефикасна метода третирања протеина непосредно пре хидролизе или истовремено током одвијања хидролизе.<sup>157</sup> Деловање ултразвучне кавитације у области протеомике огледа се у брзој промени температуре, притиска, смицајних сила и твз. ударних таласа што свеукупно резултира мешањем реакционих компоненти и протеолитичкој хидролизи.<sup>158</sup> Примена ултразвука у производњи биоактивних протеина и/или пептида како у области фармацеутске биотехнологије тако и у области прехранбене биотехнологије шематски је приказана на Сликама 4.5 и 4.6.

Први резултати о утицају ултразвука на ензимску активност датирају још од 1980-те. У овим најранијим истраживањима утврђено је да ултразвук утиче на повећање ензимске активности  $\alpha$ -химотрипсина, каталазе, малат дехидрогеназе и липаза.<sup>159-161</sup> Насупрот наведеном, у другим истраживањима показано је да поновним деловањем ултразвука долази до инактивације ензима, која се објашњава настанком слободних радикала током кавитационог ефекта у воденом медијуму, смицајних сила и/или имплозије кавитационих мехура.<sup>162</sup> Ју (Yu) и сарадници су у својој студији показали да утицај кавитације на активност ензима пре свега зависи од специфичности и структуре ензима. У свом истраживању они су дошли су сазнања да се при истим условима ултразвучног третмана (фреквенце 40 kHz и снаге  $278,8 \pm 7,4$  W) активност  $\alpha$ -амилазе и папаина смањује, док се ултразвучним третманом пепсина активност побољшава, а уочене промене приписују варијацијама примарне и секундарне структуре упоређених ензима.<sup>163</sup>



Слика 4.5. Примена биоактивних протеина и/или пептида у чију фазу производње је укључен ултразвук.<sup>140</sup>



Слика 4.6. Примена ултразвука у процесима прехранбене биотехнологије.<sup>140</sup>

У поређењу са традиционалним методама обраде протеина у протеомици, ултразвучни третман захтева значајно мању количину узорка протеина и у ту сврху користе се две врсте ултразвучних уређаја. У питању су ултразвучно купатило и ултразвучна сонда, који се међусобно значајно разликују по интензитету, тј. снази. Наиме, због ниже ултразвучне снаге, третман ултразвучним таласима у купатулу је у погледу времена трајања дужи у односу на ултразвучне таласе генерисане сондом. Међутим, применом купатила, оствараје се мање стандардно одступање како у погледу јаснијих масених спектра добијених пептида, тако и у погледу њиховог приноса наспрот ултразвучној сонди, указујући на чињеницу да приликом протеоматског анализирања ултразвук високог интензитета доводи до деградације.<sup>164</sup> Ипак, хидролиза протеина и/или пептида уз ултразвучни третман значајно убрзава одређене фазе протеомике, денатурацију, редукцију, алкилацију и дигестују.<sup>156</sup>

Поред значајне примене у детекцији пептида, ултразвук се у великој мери користи и за екстракцију биоактивних једињења из нативних компонената. Конкретно, прегледом научних студија запажено је да се ултразвук високог интензитета користи за екстраховање/изоловање протеина најразличитих природних извора: соја,<sup>165</sup> пшеничне клице,<sup>166</sup> обезмасћене пиринчане мекиње,<sup>167</sup> уљана репица,<sup>168</sup> и др. Управо имплозија кавитационих мехура, формирање микро-цепова, микро-турбуленација, велика брзина међучестичних судара и пертурбације у микропорозним честицама изазване ултразвуком високог интензитета доводе до повећања приноса екстракције протеина, повећане растворљивости и убрзања

хемијских реакција током екстракције/изоловања које се пре свега односе на дезинтеграцију структуре биљних ћелија.<sup>169</sup>

У производњи биолошки активних пептида из нативних протеина, ултразвук као физички третман заузима значајно место највише у сврху изоловања антиоксидативних и антихипертензивних пептида. Јиа (Jia) и сарадници су употребили ултразвучни предтретман како би побољшали разградњу протеина пшеничних клица у циљу производње пептида са инхибиторном АСЕ-активности. Том приликом, коришћењем ултразвука фреквенце 22 kHz и снаге 40 W, уочено је повећање степена хидролизе и нивоа антихипертензивне активности ослобођених пептида.<sup>170</sup> Са аспекта деловања ултразвука, пептиди ослобођени хидролизом протеина третираних ултразвуком високог интензитета генерисаног сонодом испољили су већу способност инхибирања АСЕ наспрам пептида ослобођених из протеина третираних таласима у ултразвучном купатилу.<sup>171</sup> Антиоксидативна активност протеинског хидролизата добијеног хидролизом ултразвучно третираних протеина кикирикија значајно је унапређена, а у овом случају ултразвучни третман изведен је заједно са хидролизом у ултразвучном купатилу при снази 150 W.<sup>172</sup> Ултразвук фреквенце 25 kHz и интензитета 0,707 W/cm<sup>2</sup> искоришћен је за припрему хидролизата пшеничног глутена унапређених антиоксидативних активности, пре свега метал-јон хелатне и АВТS радикалске активности.<sup>173</sup> У истој научној студији наведено је да расподела молекулске масе ослобођених пептида зависи од фреквенце ултразвука, и да су пептиди мање молекулске масе заступљенији у случају примене ултразвука ниже фреквенце. У погледу расподеле молекулских маса пептида, пептиди садржани у фракцијама масе <10 kDa поседују највеће антиоксидативне способности, тако да се може закључити да ултразвук значајно потпомаже одлобађање биолошки активних пептида малих молекулских маса.<sup>174</sup> У случају ослобађања биолошки активних пептида и унапређења биоактивних својстава, као свеобухватно деловање ултразвука наводи се повећање степена површинске хидрофобности, од. услед слабљења водоничних и хидрофобних интеракција већа је изложеност хидрофобног региона, повећање садржаја слободних сулфхидрилних група и степена хидролизе.<sup>14</sup>



## **5. ИЗОЛОВАЊЕ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПЕПТИДА ПРОТЕИНА БЕЛАНЦЕТА ПРИМЕНОМ РАЗЛИЧИТИХ СЕПАРАЦИОНИХ ТЕХНИКА**

Након контролисане и парцијалне ензимске хидролизе нативних протеина често је неопходно фракционисање и пречишћавање хидролизата, чији састав чини смеша пептида, применом биосепарационих техника. У том контексту, ултрафилтрација је свакако једна од најчешће коришћених биосепарационих техника јер омогућава раздвајање протеинских хидролизата на фракције пептида тачно дефинисаних молекулских маса у распону од великих до малих. Молекулска маса представља важан параметар који се одражава на ензимску хидролизу протеина, што је додатно у корелацији са биолошком активношћу протеинских хидролизата.<sup>14</sup> У складу са наведеним, а зарад што прецизнијег и квантитативно веродостојнијег изоловања биолошки активних фракција пептида, у оквиру ове докторске дисертације дефинисана је ултрафилтрација уз коришћење мембрана различитих величина пора и различитих граничних вредности молекулске масе која не може проћи кроз поре (*на енгл.* molecular weight cut-off, MWCO), као важан корак у производњи биолошки активних пептида.

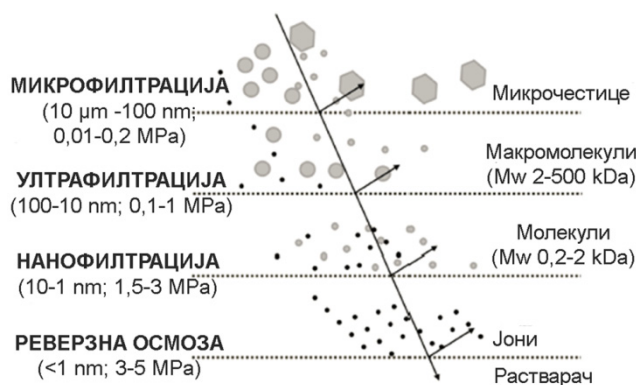
### **5.1. СЕПАРАЦИЈА ПРОТЕИНСКИХ ХИДРОЛИЗАТА ПРИМЕНОМ УЛТРАФИЛТРАЦИОНИХ И ХРОМАТОГРАФСКИХ ТЕХНИКА**

Основни задатак биосепарационих техника је ефикасно и економично издвајање пептида посебне чистоће из комплексних протеинских смеша. Протеини и/или пептиди денатурише се топлотом, не могу се упаравати или дестиловати, а производе се у малим количинама и имају тродимензионалну структуру, подложну променама током пречишћавања. Због тога, протеински хидролизати се издвајају, пречишћавају и концентришу коришћењем мембрана, адсорпције и хроматографије за чије извођење пре свега није потребна топлота или екстремна рН. За постизање најбољих резултата, потребно је обратити пажњу на карактеристике протеинских хидролизата и нативних протеина из којих потичу, као што су: величина и молекулска маса, наелектрисање и карактеристике површине, специфичност, дифузивност, растворљивост и стабилност.<sup>175</sup>

**Мембранске сепарационе технике** омогућавају раздвајање на нивоу микрочестица и молекула, па се често користе за издвајање, пречишћавање и концентрисање протеина и/или пептида. Главна подела мембранских техника сепарације извршена на основу величине пора мембрана је следећа:

- ❖ микрофилтрација – раздвајање на нивоу микрочестица ( $10\ \mu\text{m} - 100\ \text{nm}$ ),
- ❖ ултрафилтрација – раздвајање на нивоу макромолекула ( $100 - 10\ \text{nm}$ ),
- ❖ нанофилтрација – раздвајање на нивоу молекула ( $10 - 1\ \text{nm}$ ) и
- ❖ реверзна осмоза – раздвајање на нивоу молекула и јона ( $< 1\ \text{nm}$ ).

Иако се домени примене неких од наведених техника преклапају, у погледу величине честица и молекула важи да је микрофилтрација повезана са раздвајањем на нивоу микрочестица, ултрафилтрација на нивоу макромолекула, нанофилтрација на нивоу микромолекула, а реверзна осмоза на нивоу најмањих молекула и јона (Слика 5.1).<sup>175</sup>



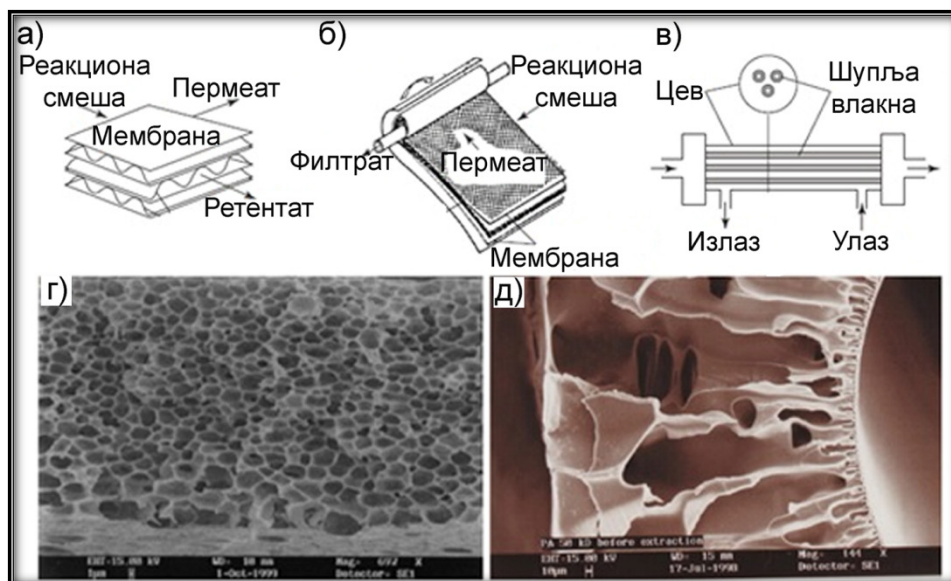
**Слика 5.1.** Шематски приказ различитих мембранских сепарационих техника у погледу величине пора мембрана.

**Ултрафилтрација** је мембрански сепарациони процес који се одвија под дејством притиска, при чему се поред растварача раздвајају и поједине компоненте из раствора, у зависности од њихове молекулске масе и структуре. Суспендоване чврсте честице и раствори велике молекулске масе се задржавају и представљају ретентат, док су вода и мали молекули садржани у пермеату и несметано пролазе кроз мембрану. Ултрафилтрација има моћ раздвајања једињења чија је молекулска маса у распону од 2 kDa до 500 kDa. Овај процес разликује се од реверзне осмозе и нанофилтрације по величини молекула који се одвајају, притисцима који се употребљавају, изгледу мембранских модула (поред спиралних намотаја, чешће се користе и мембране са шупљим влакнима и цевне мембране), као и полимерима који се користе за израду мембрана. Величина пора ултрафилтрационих мембрана је између  $0,01\ \mu\text{m}$  где се граничи с процесом микрофилтрације и неколико nm одакле

почиње подручје нанофилтрације. Једноставност конструкције, кратко време сепарације и ниска цена су главне предности ултрафилтрације над конвенционалним поступцима сепарације, као што је екстракција, селективна преципитација или хроматографска сепарација. Ултрафилтрација у индустријским процесима има широк спектар примене: у производњи млечних прерађевина за концентровање млека и сурутке, у фармацеутској, текстилној и хемијској индустрији, металургији и индустрији папира. Често се користи и за бистрење воћних сокова, пива и вина. У технологији воде се користи за уклањање органских молекула веће масе из воде, као и за уклањање колоида као што су гвожђе или силикати.<sup>176</sup>

**Ултрафилтрационе мембране** (Слика 5.2) су углавном асиметричне (анизотропне), што значи да према улазном раствору мембрана има најмање поре које се кроз пресек мембране повећавају према страни пермеата, омогућавајући филтрацију и чврстоћу мембране коју даје дебљи, порознији део. Будући да ултрафилтрација не одваја мале молекуле односно јоне, при филтрацији се не савладава велики осмотски притисак. Зато су притисци знатно нижи (до 50 psi), а пермеабилност мембране значајно виша него код реверзне осмозе и нанофилтрације. Поре код ултрафилтрационих мембрана довољно су велике да молекули расстварача лако пролазе кроз њих, док се биолошки молекули веће молекулске масе готово потпуно задржавају. Међутим, неповољни ефекат поларизације концентрације код ултрафилтрације може бити знатно већи него код реверзне осмозе. Због тога је могуће стварање слоја гела на површини мембране, чиме се пролаз расстварача знатно успорава.<sup>176</sup> На основу њихове величине пора, употреба сепарационих мембрана у области протеина и/или пептида може се поделити на неколико примена:

- сепарација пептида и нехидролизованних протеина или протеолитичких ензима са ултрафилтрационим мембранама чији је опсег раздвајања и до 20 kDa,
- фракционисање протеинских хидролизата кроз ултрафилтрационе мембране опсега раздвајања 4-8 kDa,
- концентровање раствора пептида у виду фракција применом нанофилтрационих мембрана опсега раздвајања 200-300 Da,
- пречишћавање раствора у погледу одсољавања, нанофилтрацијом у режиму дијафилтрације.<sup>177</sup>



Слика 5.2. Различити типови мембрана и мембранских модула: а) плочаста мембрана, б) спирална мембрана, в) мембрана у облику шупљих влакана, г) симетрична мембрана и д) асиметрична мембрана.<sup>178</sup>

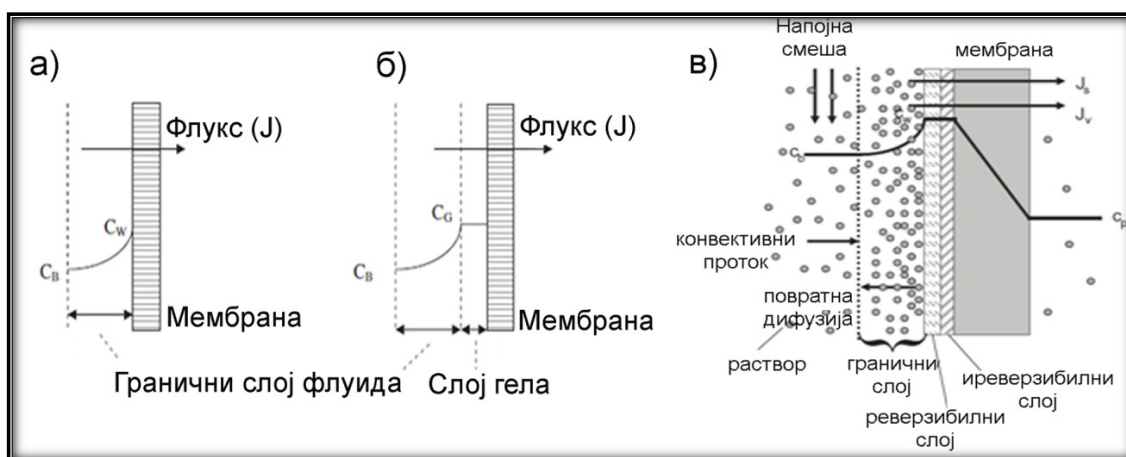
**Концентрациона поларизација** (Слика 5.3а) представља акумулацију честица на површини мембране што има за последицу смањење протока напојне смеше, а дешава се у случају различите пермеабилности растворених биолошких молекула и растварача у мембрани и то на граничном слоју у близину мембране. Код ултрафилтрације растварач брже пролази кроз мембрану од растворених биолошких молекула, па је концентрација растворених молекула на површини мембране већа од концентрације у маси раствора, што доводи до отпора преносу масе кроз мембране. Утицај концентрационе поларизације на ултрафилтрацију је велики, а разлог томе је управо мали коефицијент преноса масе. На концентрациону поларизацију утичу различити фактори, као што су: 1) трансмембрански притисак, 2) проток, 3) температура и 4) концентрација напојне смеше. Концентрациона поларизација се описује са неколико различитих модела од којих је за конкретни случај ултрафилтрације протеинских хидролизата најприкладнији модел гел-поларизације, с обзиром да је задржавање протеина на мембрани веома велико. Овај модел претпоставља да је концентрација у слоју гела константна и да се повећањем разлике притиска повећава дебелина слоја гела, а не флуks кроз мембрану.<sup>179</sup>

**Прљање мембране** (на енгл. fouling) представља општи појам за акумулацију честица на површини мембране или унутар пора мембране. Разликују се две врсте прљања: реверзибилно прљање, које се може смањити прилагођавањем

хидродинамичких услова (брзина или трансмембранског притиска) и иреверзибилно прљање, чији се ефекат не може избећи нити умањити. Према механизму настанка, подељено је у неколико група:

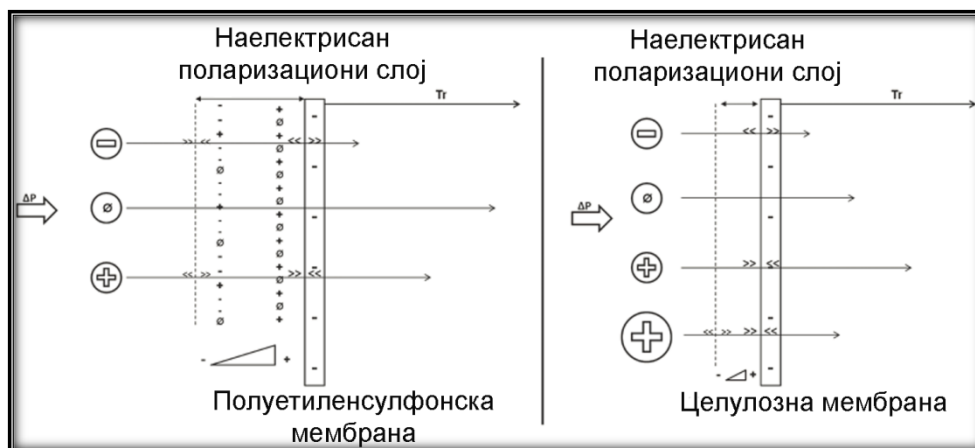
- образовање слоја гела услед концентрационе поларизације (Слика 5.3б),
- адсорпција на површини мембране и унутар пора мембрана,
- таложење и запушење пора након образовања протеинских агрегата услед денатурације.

Иако иреверзибилно прљање мембране производи из концентрационе поларизације, од ње се разликује по томе што се не може једноставно отклонити променом хидродинамичких услова у мембранском модулу. Генерално, оно је мање уколико је мања концентрациона поларизација. Једна од стратегија смањења прљања мембране је и обрatan ток пермеата чиме се услед протицања физички уклања слој наталожених честица са површине мембране. Прљање мембране је нарочито изражено при ултрафилтрацији протеина када се одвија на рН блиској вредности изоелектричне тачке протеина. Сматра се да су протеини изразито хидрофобни у оваквим условима, и да се адсорбују на мембрани услед повећања хидрофобних интеракција. Добро је позната чињеница да се мембране израђене од хидрофобних материјала прљају брже од хидрофилних мембрана, што је у складу са претходно изнетим. Такође, постоји становиште да протеини при изоелектричној тачки међусобно стварају агрегате услед смањеног електростатичког одбијања и ови агрегати узрокују запушење пора мембране.<sup>180</sup>



Слика 5.3. Пренос масе током ултрафилтрације: а) концентрациона поларизације, б) гел поларизација, в) прљање мембране.<sup>176</sup>

За фракционисање протеинских смеша на индустријском нивоу, ултрафилтрација и нанофилтрација су показале високоенергетску ефикасност, лако увећање и смањење размера опреме приликом рада (*на енгл.* scale-up и scale-down), минималан хемијски и механички стрес, рад на умерим температурама, избегавајући на тај начин деградацију производа. Научне студије истичу да је механизам под којим се одвија сепарација пептида кроз наелектрисане мембране (Слика 5.4) резултат заједничког утицаја величине и наелектрисања, тако да раздвајање пептида у највећој мери зависи искључиво од физичко-хемијских својстава протеинског хидролизата (pH и јонске јачине) и карактеристика пептида у њему (молекулске масе, изоелектричне тачке и хидрофобности). Интеракције типа пептид-пептид и пептид-мембрана значајно утичу на сепарациони процес, због чега је управо тешко предвидети селективност мембрана када се фракционише сложена смеша пептида.<sup>181</sup> На лабораторијском нивоу, изоловање лизозима из нативних протеина беланцета извршено је коришћењем ултрафилтрационих мембрана. Ефикасност две мембране, полиетиленсулфонске и целулозне, је упоређено и утврђено је да се се при веома благим оперативним условима (pH~10, јонска јачине напојне смеше 100 или 200 mMNaCl), полиетиленсулфонска мембрана показала као ефикаснија у поређењу са целулозном мембраном. Са полиетиленсулфонском мембраном остварен је висок принос протеинске фракције лизозима, чак 80%, док је чистоћа била >94%.<sup>182</sup> У неколико научних истраживања анализиран је хидрофилно/хидрофобни карактер ултрафилтрационих мембрана у погледу утицаја на фракционисање протеинских хидролизата и употребном хидрофилних мембрана остварен је мањи принос биолошки активних пептида. На тај начин примена хидрофилних мембрана за сепарацију протеинских хидролизата због лоше ефикасности раздвајања пептида, није адекватна. Стога, у новијим истраживањима примењују се наелектрисане ултрафилтрационе мембране, као и процеси у којима су купловане ултрафилтрационе мембране са електричним пољем или ултразвучним таласима.<sup>180</sup> Двостепеним поступком ултрафилтрације са полиетиленсулфонским мембранама у облику диска величине пора за које је гранична молекулска маса 30 и 50 kDa, изолован је овалбумин из нативних протеина беланцета. Публиковани резултати показали да је двостепеном ултрафилтрацијом остварена висока пречишћеност овалбумина (98,7% суве материје) при оперативном трансмембранском притиску 4,5 kgf/cm<sup>2</sup>, брзини мешања 200 o/min, pH 2,5 и односу беланце:раствор 1:1.<sup>183</sup>

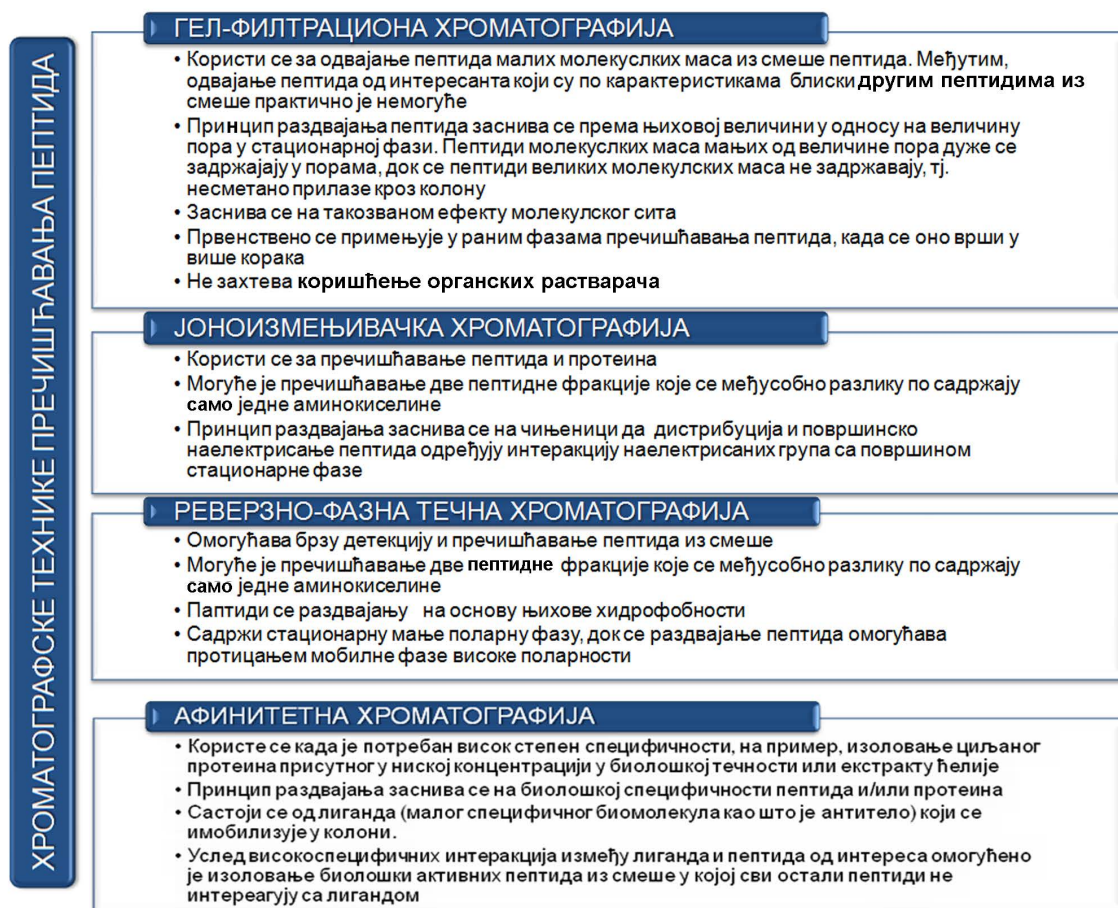


**Слика 5.4.** Шематски приказ електростатичких сила између негативно наелектрисане мембране, поларизационог слоја и пептида који показује другачије наелектрисује при различитим рН. Символ («») представља електростатичке силе узајамног одбијања, док симбол («») представља електростатичке силе узајамног привлачења.<sup>181</sup>

Када се протеински хидролизати фракционишу на фракције пептида, пречишћавање и изоловање биолошки најактивних пептида врши се применом хроматографских техника као што су: **реверзно-фазна течна хроматографија, јоноизмењивачка хроматографија и гел-филтрациона хроматографија.** Наведене хроматографска технике, ради лакше прегледности и сумарања што већег броја информација у погледу примене и карактеристика, шематски су приказане на Слици 5.5. У највећем броју случајева, како би се изоловали пептиди са високим степеном пречишћености, неопходно је комбиновање две или више хроматографских техника раздвајања.<sup>14, 184</sup>

Како је производња и примена биолошки активних пептида све заступљенија, са аспекта пречишћености пептида постоје тачно дефинисани опсези дозвољених степена нечистоће, у зависности од намене, а потеклих од незавршених и/или споредних реакција. Пептиди синтетисани за терапеутска и клиничка истраживања, као и за биолошке студије испитивања корелације између структуре и активности, морају имати висок степен чистоће  $\geq 95\%$ . Међутим, у другим областима примене толеришу се ниже вредности степена чистоће, између 70% и 95% (Слика 5.6). Пречишћавање пептида искључиво зависи од технике сепарације и у складу са тиме пептиди се могу добити у: 1) препаративним количинама (количина у грамима) када се једна или више појединачних компоненти изолоује из смеше пептида и као таква користи за даље анализе и 2) аналитичким количинама ( $\sim 1$  mg пептида) када се превасходно врши идентификација и квантитативно одређивање удела појединачних

пептида у смеси. Чистоћа изолованих пептида најчешће се верификује методом другачијом од оне која се користила за пречишћавање, с обзиром на то да резултати хомогености из система као што је смеша пептида могу дати погрешне информације. Дакле, карактеризацију пептида потребно је извршити применом различитих метода масене спектрометрије, које се заснивају на прецизном одређивању односа молекулске масе и наелектрисања пептида, као и на одређивању хемијске структуре, при чему се свака од њих карактерише високом осетљивошћу и резолуцијом. За карактеризацију пептида могу се користити три врсте масене спектрометрије које се разликују по методама јонизације: електроспреј-тандем масене спектрометрија (ESI-MS), масена спектрометрија са брзим атомским бобардовањем (FAB-MS) и масена спектрометрија са ласерском десорпцијом/јонизацијом (MALDI-MS).<sup>70, 184</sup>



**Слика 5.5.** Хроматографске методе учестало коришћене за пречишћавање пептида и додатно изоловање истих из фракционисаних смеша пептида (*описи метода преузети из литературних података<sup>184</sup>*).





Слика 5.6. Степен пречишћености биоактивних пептида са аспекта њихове примене (опис преузет из литературних података<sup>70</sup>).

## 5.2. МЕМБРАНСКЕ ТЕХНОЛОГИЈЕ ЗА РАЗВОЈ ЕНЗИМСКИХ МЕМБРАНСКИХ РЕАКТОРА

Корисна и ефикасна примена мембранских технологија, као што је ултрафилтрација даје полазну основу за развој ензимских мембранских реакторских система који омогућавају истовремено одигравање ензимског процеса и сепарације насталих пептида. Најчешће се користе полимерне мембране, јер се добијају у најразличитијим облицима и лако се модификују (Слика 5.2). Основне карактеристике ових мембрана јесу хемијски састав, распоред и величина пора, дебљина и отпорност на притисак и различите температуре. Такође, у мембранским реакторима могуће је ензимску хидролизу изводити континуално као и остварити велику граничну површину за одвијање реакције применом порозних мембрана или оних у облику шупљих влакана.<sup>178</sup>

Прегледом доступне савремене литературе за процесе хидролизе протеина из природних сировина издвојена су два мембранска реакторска система као решења за успешнију хидролизу у погледу веће ефикасности и већег приноса биолошки активних пептида. Први систем, **мембрански реактор са протеазом имобилисаном у порама мембране** наметнуо се као ефикасан систем за рецикулацију протеолитичких ензима и поуздану контролу степена хидролизе и

састава хидролизата. На тај начин, омогућено је лако заустављање реакције без термичког третирања биокатализатора просто уклањањем мембране, рециклација ензима и одвијање реакције и сепарације производа од ензима у истој јединици, али не и међусобно раздвајање хидролизата на појединачне фракције. **Код проточног реактора са мешањем са мембранским модулом**, ензимски реактор и мембрански модул су две одвојене јединице што усложњава технолошки процес и повећава ризик од контаминације. Код ових реактора, протеазе нису имобилисане у мембрани, већ су слободне у раствору, док мембрана служи за раздвајање производа мале молекулске масе од ензима и недовољно хидролизованог производа веће молекулске масе. Међутим велика предност оваквог процеса је у томе што се хидролизат може развојити у различите фракције на основу молекулске масе производа. Тако, пажљивом оптимизацијом величина пора мембране ултрафилтрационе јединице добијају се хидролизати са ди-, три- и олигопептидима веома уског распона молекулске масе, односно жељених биолошких својстава.<sup>185-186</sup>

Иако употреба мембранских реактора омогућава истовременно одвијање реакције хидролизе и сепарацију производа, мембрански реактори имају поред предности и одређене недостатке. Предности коришћења мембранских реактора јесу:<sup>187</sup>

- могућност развоја континуалног процеса,
- висока продуктивност,
- већа контрола процеса хидролизе,
- интеграција оперативних јединица,
- померање равнотеже реакције у смеру настанка производа,
- смањење инхибиције производом,
- обогаћивање и концентровање производа у току процеса,
- контрола молекулске масе добијених хидролизата,
- могућност извођена вишестепених реакција хидролизе,
- омогућено праћење механизма деловања ензима.

У погледу недостатака везаних за коришћење мембранских ензимских реактора издваја се неколико најчешће примећених:<sup>187</sup>

- неповољна адсорпција и контаминација ензима,
- дезактивација ензима ефектима смицајних сила,
- концентрациона поларизације,

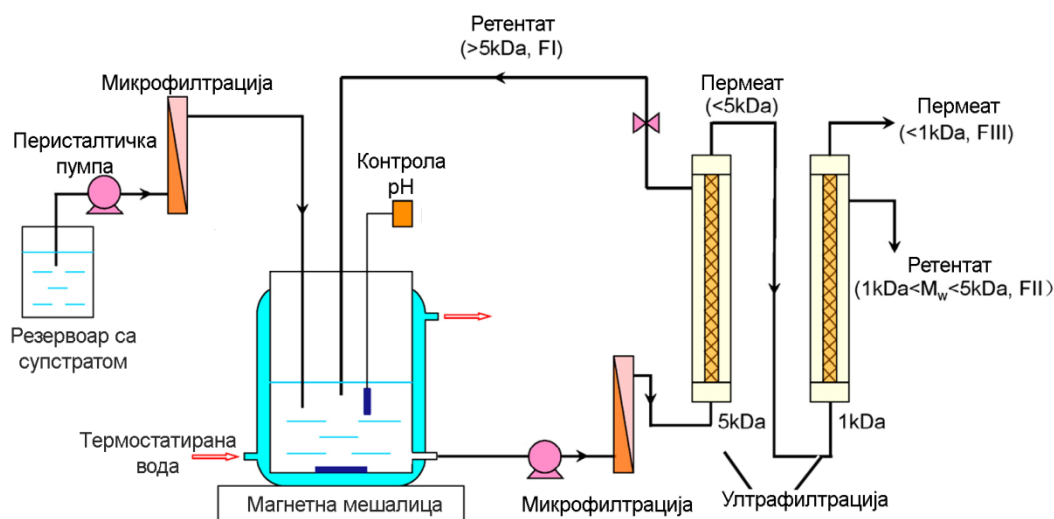
- прљање мембране,
- истицање ензима,
- инхибација производом/супстратом,
- смањење перформанси током извођења изазвано губитком каталитичке ефикасности и преноса масе,
- губитак активатора или кофактора ензима.

Ензимски мембрански реактори као технолошко решење за континуалну производњу специфичних пептида увелико се примењује за припрему хидролизата, тј. смеше пептида унапређених нутритивних и биолошких својстава. У том контексту, реактори са мембранским сепарационим јединицама показали су већу ефикасност, продуктивност и униформнији састав биоактивних пептида у поређењу са шаржним реакторима, и то пептида са побољшаним својствима антихипертензивне и антиоксидативне активности,<sup>186, 188-189</sup> као и смањене алергености.<sup>190</sup> Међутим, мембрански реакторски системи су генерално употребљени за добијање само једне врсте специфичних пептида, док је истовремена производња пептида са различитим биоактивностима слабије истражена. Из тога разлога, као један од циљева истраживања ове докторске дисертације била је производња управо пептида са различитим биолошким активностима.

Узимајући у обзир претходно наведене чињенице, међу научним истраживањима издваја се поступак производње три мултифункционална пептида (фофосфопептид, антихипертензивни и антимикуробни пептиди) хидролизом казеина у проточном реакторском систему са микрофилтрационом јединицом (0,45  $\mu\text{m}$ ) и две ултрафилтрационе јединице *cut-off* 5 и 1 kDa, везане на ред (Слика 5.7).<sup>185</sup> Након три сата континуалног поступка хидролизе казеина и сепарације производа реакције добијене су три фракције производа различитог опсега молекулских маса. Произведене фракције пептида молекулских маса веће од 1 kDa раздвојене су на јоноизмењивачкој колони на анјонске пептиди (фосфопептиде) и катјонске пептиде (пептиде са високом антимикуробном активношћу према соју *Staphylococcus aureus* (97,49% са 1,0 mg/cm<sup>3</sup>)). Применом гел-филтрационе хроматографије изловани су пептиди за које је утврђено да су инхибитори АСЕ.

Испитавњем оперативне стабилности мембранског реакторског система са мембранском сепарационом јединицом (*cut-off* 1 kDa) у којем су протеини беланцета хидролизоване термолизом стабилна производња хидролизата остварена је током

свих осам сати. У том периоду ензим није изгубио своју активност, а у било ком тренутку рада мембранског реактора  $IC_{50}$  вредност антихипернетзитивне активности није била мања од  $18 \text{ mg/cm}^3$ .<sup>188</sup> Ова група аутора је поређењем продуктивности дошла до сазнања да се продуктивност у шаржном реактору са променом запремине не мења, док се у проточном мембранском реактору уочава линеаран раст продуктивности са променом запремине. Ово значи да је са сваком променом запремине система (1 литар) потребно унети нову количину ензима у шаржни систем, а да је са променом запремине продуктивност мембранског система након три измене циклуса, са ензимом унесим само на почетку процеса, била већа у односу на шаржни. Ови резултати, као и резултати других аутора су показали да рециклација ензима и његово поновно коришћење повећава продуктивност и оправдава употребу проточног мембранског реактора као ефикасно технолошко решење.<sup>186, 191</sup>



**Слика 5.7.** Шематски приказ мембранског реакторског система са две ултрафилтрационе јединице.<sup>185</sup>

Сходно наведеним истраживањима, хидролиза протеина беланцета у циљу производње фракције пептида са биолошким активностима, извешће се применом неколико типских конфигурација реакторских система:

- 1) шаржни реакторски систем, где ће се приликом оптимизације режима рада испитати утицај различитих процесних параметара на биолошку активност пептида;
- 2) проточни мембрански реактор повезан мембранском сепарационом јединицом;
- 3) континуални мембрански реактор са рецикулацијом и мембранским модулом.

*ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО*

---

## 6. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

### 6.1. МАТЕРИЈАЛИ

У реакцији ензимске хидролизе протеина беланцета као биокатализатори коришћени су протеолитички ензими:

- ❖ неспецифична ендо-пептидаза изолована из *B. licheniformis* комерцијалног назива алкалаза (на енгл. Alcalase<sup>®</sup> 2.4 L, Sigma Aldich, St. Louis, САД),
- ❖ специфична егзо- и ендо-пептидаза изолована из *A. oryzae* под називом флеворзим (на енгл. Flavourzyme<sup>®</sup> 500 L, Sigma Aldich, St. Louis, САД),
- ❖ неспецифична ендо-пептидаза изолована из *B. amyloliquefaciens* под називом неутраза (на енгл. Neutrase<sup>®</sup> 0.8 L, Sigma Aldich, St. Louis, САД) и
- ❖ ендо-пептидаза папаин изолована из латекса незрелог плода папаје-*Carica papaya* (на енгл. Papain<sup>®</sup> 1,5-10 U/mg, Sigma Aldich, St. Louis, САД).

Микробиолошки тестови, у циљу испитивања антимикробне активности хидролизата и/или изолованих фракција пептида, спроведени су на Грам-позитивним (*Staphylococcus aureus* АТСС 25923), Грам-негативним (*Escherichia coli* АТСС 25922) стандардизованим културама бактерија и квасаца (*Candida albicans* АТСС 24433) који чине део колекције микроорганизама лабораторије за микробиологију Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду. За припрему храњивих подлога коришћени су триптон соја бујон, триптон соја агар, екстракт квасца са Института Торлак (Република Србија). Неомицин у облику соли неомицин-трисулфат хидрата, неомицин В (Sigma Aldich, St. Louis, САД) коришћен је као позитивна контрола током микробиолошких тестова.

Антипролиферативна активност тестирана је на две туморске ћелијске линије: хуману ћелијску културу аденокарцинома дојке МСF-7 (АТСС, НТВ-22) и хуману ћелијску линију колоректалног аденокарцинома SW480 (АТСС, ССL-228), обе из колекције ћелијских култура америчке асоцијације American Type Culture Collection, док је испитивање цитотоксичног ефекта обухватило тестирање утицаја пептида на пролиферацију мезенхималних матичних ћелија изолованих из перидонталног лигамента, PDLSCs, као типа примарних хуманих ћелија (део колекције ћелија Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду). Антихипертензивна активност тестирана је коришћењем супстрата хипурил-Л-

хистидин-L-леуцин хидрата и ангиотензин-конвертујућег ензима, изолованог из плућног ткива зеца, декларисане активности 0,25 U (Sigma Aldrich, St. Louis, САД).

За одређивање количине хидролизованних пептидних веза у току ензимског поступка хидролизе и концентрације протеина, као и за припрему потребних реагенаса коришћене су следеће хемикалије:

- ❖ 2,4,6-тринитробензен 1-сулфонска киселина, TNBS (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ L-леуцин (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ L-пролин (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ L-цистеин (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ албумин из говеђег серума (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ бакар (II)-сулфат пентахидрат,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Zorka Pharma, Шабац, Република Србија),
- ❖ гвожђе (II)-сулфат,  $\text{FeSO}_4$  (Lachner, Neratovice, Република Чешка),
- ❖ диметилсулфоксид,  $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ , DMSO (Merck, Дармштат, Република Немачка),
- ❖ динатријум-хидроген фосфат анхидровани,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Центрохем, Стара Пазова, Република Србија),
- ❖ калај (II)-хлорид дихидрат,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ калијум-натријум-тартарат,  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$  (Merck, Дармштат, Република Немачка),
- ❖ лимунска киселина,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ натријум-дихидроген фосфат монохидрат,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Lachner, Neratovice, Република Чешка),
- ❖ натријум-додецил-сулфат, SDS (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ натријум-карбонат,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Lachner, Neratovice, Република Чешка),
- ❖ натријум-хидроксид, NaOH (Lachner, Neratovice, Република Чешка),
- ❖ натријум-хлорид, NaCl (Zorka Pharma, Шабац, Република Србија),
- ❖ натријум-цитрат дихидрат (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ нинхидрин, 2,2-дихидроксииндан-1,3-дион (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ полиетилен гликол, PEG 6000 (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ Фолинов реагенс, *на енгл.* Folin-Ciocalteu's phenol реагенс (Sigma Aldrich, St. Louis, САД) и
- ❖ хлороводонична киселина, HCl (Lachner, Neratovice, Република Чешка).

Утицај ултразвучног претретмана на структуру протеина беланцета и степен денатурације, испитан је анализирањем површинске хидрофобности молекула и садржаја сулфхидрилних група током којих су за припрему реагенаса коришћени:

- ❖ 5,5'-дитиобис-(2-нитробензоева киселина), DTNB (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ 8-анилино-1-нафталенсулфонска киселина, ANS (Sigma Aldrich, St. Louis, САД)
- ❖ глицин (Sigma Aldrich, St. Louis, САД) и
- ❖ уреа (Zorka Pharma, Шабац, Република Србија).

Биолошка активност припремљених хидролизата и изолованих пептидних фракција испитана је тестирањем антиоксидативне, антимикробне, антипролиферативне, антихипертензивне и антикоагулационе активности, а за припрему неопходних реагенаса током наведених анализа коришћени су:

- ❖ 2,2'-азино-бис(3-етилбезотиазолин-6-сулфонска киселина)-диамонијумова со, ABTS (Alfa Aesar, Масачусетс, САД),
- ❖ 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил, DPPH (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ 2-амино-2-хидроксиметил-пропан-1,3-диол, Tris (Центрохем, Стара Пазова, Република Србија),
- ❖ 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид, МТТ (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ NERES, 2-[4-(2-хидроксиетил)пиперазин-1-ил]етансулфонска киселина (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ Tween-40 (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖  $\alpha$ -дезоксирибоза (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖  $\beta$ -каротен (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ аспирин (Aspirin<sup>®</sup> 500 mg, Bayer Bitterfeld GmbH, Битерфелд-Волфен, Република Немача),
- ❖ борна киселина, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Lachner, Neratovice, Република Чешка),
- ❖ витамин Ц (Acros Organics, Њу Џерзи, САД),
- ❖ водоник-пероксида, 3% (Линуфис, Република Србија),
- ❖ гвожђе (II)-хлорид, FeCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ гвожђе (III)-хлорид, FeCl<sub>3</sub> (Центрохем, Стара Пазова, Република Србија),



- ❖ гвожђе-сулфат хептахидрат,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Lachner, Neratovice, Република Чешка),
- ❖ динамтријумова со етилендиамин-тетрасирћетне киселине, EDTA (Acros Organics, Њу Џерзи, САД),
- ❖ динамтријум-тетраборат, боракс (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ етанол, апсолутни (Центрохем, Стара Пазова, Република Србија),
- ❖ калијум-дихидроген фосфат,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Центрохем, Стара Пазова, Република Србија),
- ❖ калијум-пресулфат,  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (Lachner, Neratovice, Република Чешка),
- ❖ калијум-хексацијаноферат (III) (Lachner, Neratovice, Република Чешка),
- ❖ калијум-хлорид,  $\text{KCl}$  (Центрохем, Стара Пазова, Република Србија),
- ❖ калцијум-хлорид,  $\text{CaCl}_2$  (Центрохем, Стара Пазова, Република Србија),
- ❖ линолна киселина (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ метанол, HPLC чистоће (ProChem GmbH, Република Немачка),
- ❖ натријумова со 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-4',4''-дисулфонске киселине, ферозин (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ пирогалол (Sigma Aldrich, St. Louis, САД),
- ❖ тиобарбитурна киселина, 4,6-дихидрокси-2-меркаптопиримидин-2-тиол, ТВА (Alfa Aesar, Масачусетс, САД),
- ❖ трихлорметан, хлороформ (Центрохем, Стара Пазова, Република Србија),
- ❖ трихлорсирћетна киселина (Центрохем, Стара Пазова, Република Србија),
- ❖ Тролокс, ( $\pm$ )-6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина (Sigma Aldrich, St. Louis, САД) и
- ❖ фталалдехид реагенс, припремљен раствор *o*-фталалдехида са 2-меркаптоетанолом (Sigma Aldrich, St. Louis, САД).

## 6.2. ИНСТРУМЕНТИ

Инструменти коришћени за експериментална истраживања били су:

- ❖ UV-Vis спектрофотометар (Ultrospec<sup>TM</sup> 3300 Amersham Biosciences, Велика Британија),
- ❖ Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Вустершир, Велика Британија),
- ❖ водено купатило са шејкером (Waterbath MS3, Memmert, Република Немачка),

- ❖ магнетна мешалица (Heidolph MR 3001, Heidolph Instruments, Schwabach, Република Немачка),
- ❖ магнетна мешалица са аутоматском регулацијом температуре (C-MAG HS 7 и ETS-D6, ИКА<sup>®</sup>, Република Немачка),
- ❖ мембрански модул (Vivaflow 50, 10000 MWCO PES, Sartorius Stedim Biotech, Гетинген, Република Немачка),
- ❖ микроцентрифуга са хлађењем (Heraeus<sup>™</sup> Fresco<sup>™</sup> 21 Microcentrifuge, Thermo Fisher Scientific, САД),
- ❖ перисталтичка пумпа (Hei-FLOW Precision 06, Heidolph Instruments, Schwabach, Република Немачка),
- ❖ перисталтичка пумпа (Labor-Schlauchpumpe PLP 66, Behr Labortechnik, Република Немачка),
- ❖ рН метар (Eutech Instruments, Република Немачка),
- ❖ пропелерска мешалица са 4 пропелера (Heidolph RZR 2020, Република Немачка),
- ❖ спектрофлуориметар (Horiba FluoroMax-4, Horiba Jobin Yvon GmbH, Република Немачка),
- ❖ спреј-драјер (Mini Spray Dryer Dryer B-290, Büchi, Швајцарска),
- ❖ ултразвучна сонда, тип HD 2200, радна фреквенца  $20 \pm 0,2$  kHz (Sonopuls Ultrasonic Homogenizers, Bandelin, Република Немачка),
- ❖ ултразвучно купатило, радна фреквенца 35 kHz (Bandelin electronic, sonorex digites, DT 102 H, Република Немачка),
- ❖ ултразвучно купатило, тип USK 28, радна фреквенца  $40 \pm 2$  kHz (EI Niš-Ro-Ver, Ниш, Република Србија),
- ❖ ултрафилтрациона јединица (Millipore Corporation, Bedford, Масачусетс, САД),
- ❖ уређај за течну хроматографију под високим притиском (Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific, Thermo Scientifics, САД),
- ❖ фракциони колектор (Fraction Collector C-660, Büchi Labortechnik AG, Швајцарска),
- ❖ центрифуга (Sigma 2-16 Benchtop, Њутаун, Велика Британија) и
- ❖ читач микротитарских плоча (Multiscan GO, Thermo Fisher Scientific, Волтам, Масачусетс, САД).

## 6.3. МЕТОДЕ

### 6.3.1. Припрема протеина беланцета за ензимску хидролизу

Изоловање и карактеризација биолошки активних пептида извршени су из нативног беланцета, нетретираног или претретираног различитим физичким третманима. У ту сврху коришћено је беланце свежих кокошијих јаја (pH 7,6-8,6) набављених у локалном супермаркету произвођача ПКБ „Inshiri“ (Падинска Скела, Република Србија), а чуваних на 4 °C и коришћених током 24 сата након сакупљања. Супстрат беланцета припремљен је физичким одвајањем беланцета од жуманцета и уклањањем хелазе, а потом је нежно механички мешано током додавања воде до постизања хомогене смеше без образовања пене. Водени раствор беланцета,<sup>a</sup> масене концентрације 10%, за сваки серију експеримената припремљен је у дејонизованој води (18,2 MΩ) произведеној у систему за пречишћавање воде (Barnstead Smart2Pure, Thermo Fisher Scientific, САД).

### 6.3.2. Претретман протеина беланцета ултразвучним таласима високог интензитета

Водени раствор беланцета, масене концентрације 10%, претретиран је ултразвучним таласима високог интензитета помоћу две по механизму рада различите апаратуре:

- ❖ ултразвучни хомогенизатор са сонотродом, тј. ултразвучна сонда (*на енгл. probe-type sonicator*) и
- ❖ ултразвучно водено купатило (*на енгл. ultrasound cleaning bath*).

Приликом **претретмана ултразвучном сондом**<sup>b</sup> (фреквенце  $20\pm 0,2$  kHz и максималне амплитуде 40%,  $50\pm 2$  μm) као извор ултразвучних таласа високог интензитета коришћена је титанијумска сонотрода пречника 13 mm. Амплитуда је у овом случају представљена као проценат излазне нормалне снаге уређаја. Урањањем сонотроде у реакциони суд са течним медијумом<sup>c</sup> на дубини од  $53\pm 1$  mm, са врха сонотроде ултразвучни таласи су се преносили директно кроз медијум, чија је температура одржавана константном током процеса соникације ( $25\pm 1$  °C) протицањем термостатиране воде. Проток термостатиране воде кроз водени плашт

---

<sup>a</sup>  $11,0\pm 0,9$  mg/cm<sup>3</sup> концентрација протеина у беланцету одређена стандардном методом по Кјелдалу (Kjeldahl),  $N \times 6,25$ .

<sup>b</sup> У даљем тексту: **претретман УС-20 kHz**

<sup>c</sup> Укупна дубина течног медијума у реакционом суду била је 110 mm.

рекационог суда износио је 5-10 cm<sup>3</sup>/s. Капацитет реакционог суда био је 600 cm<sup>3</sup>, а запремина узорака одржавана је константном у свим експериментима и износила је 360 cm<sup>3</sup>. Процес соникације изведен је у различитим временским интервалима 2, 5, 10, 15 и 20 минута.

**Претретман** ултразвучним таласима високог интензитета и ниске фреквенце 40±2 kHz изведен је у **ултразвучном воденом купатилу**<sup>d</sup> (снаге генератора и грејне снаге 600 и 1200 W, редом) при константној собној температури како би се избегла денатурација протеина беланцета. Унутрашње димензије воденог купатила износиле су 40×20×20 cm, а емитујућа површина ултразвучних таласа у читавом купатилу износила је 196 cm<sup>2</sup>. Претретман је изведен урањањем реакционог суда са узорком у ултразвучно купатило и соничирањем током 5, 15, 30, 60 и 90 минута. Узорци су претретирани у реакционим судовима капацитета 600 cm<sup>3</sup>, при чему је запремина узорака била константна и износила је 360 cm<sup>3</sup>. Почетна температура дестиловане воде у ултразвучном купатилу током извођења претретмана одржавана је константном (25±1 °C) и мерана је помоћу термопара са дигиталним показивачем.

Како би се спознао утицај ултразвучних претретмана на структурне промене у молекулама протеина беланцета, нарочито на доступност пептидних веза протеолитичким ензимима током ензимске хидролизе и ослобађање биолошки активних пептида, за сваку серију експеримената изведен је и конвенционалан **термички претретман** раствора протеина беланцета. У ту сврху, водени раствор беланцета, масене концентрације 10% третиран је толотом на високој температури од 75 °C уз константно мешање коришћењем механичке мешалице при брзини 240 o/min и одржавању исте температуре током 30 минута применом магнетне мешалице са регулацијом температуре (C-MAG HS 7, ИКА, Немачка).

### 6.3.3. Одређивање снаге и интензитета ултразвука

Ултразвучни таласи током соничирања различитих медијума, услед ослобађања енергије, доводе до загревања медијума, тако да је могуће пратити промену температуре у медијуму (при адијабатским условима) и на тај начин добити податке о вредностима тзв. акустичне снаге односно интензитета примењеног ултразвука. Како би се утврдила акустична снага ултразвучне сонде и ултразвучног купатила коришћених за претретман раствора протеина беланцета, промена почетне

---

<sup>d</sup> У даљем тексту: **претретман УК-40 kHz**

температуре ( $T$ ) у односу на време ( $t$ ) у временским интервалима праћена је термопаром са дигиталним показивачем и рачунато је средње повећање температуре. Временски интервал мерења температуре зависио је од времена соницирања узорака. Снага је израчуната калориметријски према следећој једначини:<sup>192</sup>

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

где је  $m$  маса ултразвучно претретираног медијума (g),  $C_p$  је специфичан топлотни капацитет воде (4,18 kJ/(g·K)) и  $(dT/dt)$  је почетна брзина промене температуре током времена ултразвучног претретмана. Конкретно, повећање температуре процењено је из нагиба праволинијског дела добијеног у почетним временима соницирања. Процењене вредности акустичне снаге ултразвучне сонде ( $20 \pm 0,2$  kHz) и ултразвучног купатила ( $40 \pm 2$  kHz) износиле су  $30,7 \pm 0,4$  и  $21,3 \pm 0,3$  W, редом.

Интензитет ултразвучне снаге расуте из ултразвучне сонде фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz израчунат је према следећој једначини:<sup>193</sup>

$$I = \frac{P}{\pi r^2} \quad (6.2)$$

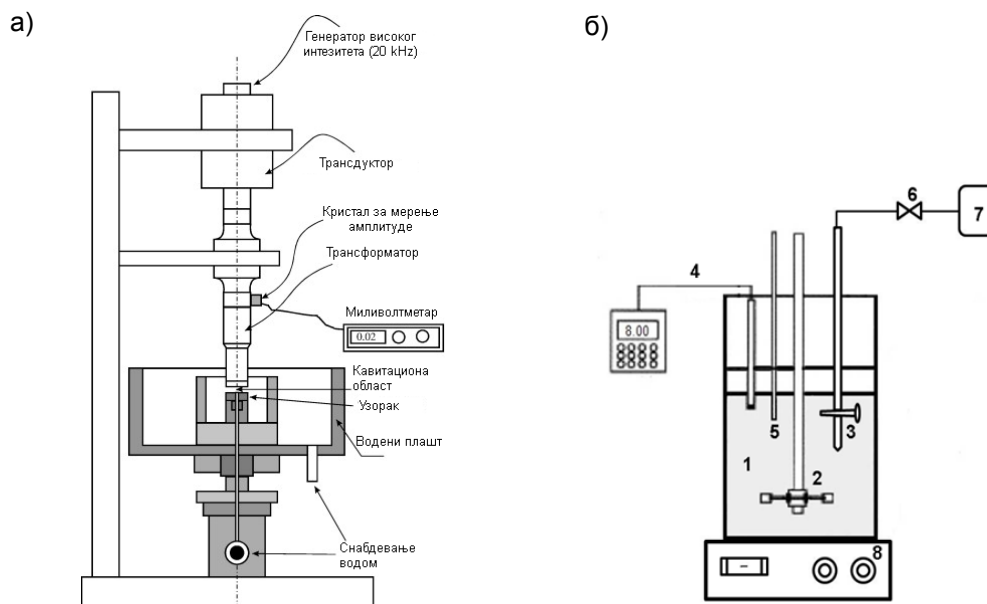
где је  $r$  полупречник титанијумског наставка (cm) и  $P$  је процењена снага ултразвучне сонде и/или ултразвучног купатила (W). Израчуната вредност интензитета ултразвучне сонде износила је  $22,8$  W/cm<sup>2</sup>. За израчунавање интензитета снаге ултразвучног купатила фреквенце  $40 \pm 2$  kHz коришћена је емитујућа површина у складу са коришћеним реакционим судом, а добијена вредност интензитета износила је  $1,12$  W/cm<sup>2</sup>.

#### 6.3.4. Ензимска хидролиза протеина беланцета у шаржном реактору са механичким мешањем

**Ензимска хидролиза протеина беланцета** изведена је у шаржном реакторском систему (капацитета 600 cm<sup>3</sup>) са механичким мешањем коришћењем пропелерске мешалице са 4 пропелера (Heidolph RZR 2020, Немачка) при брзини мешања 240 o/min. Додатно, апаратуру шаржног реакторског система чинили су: грејна јединица, тј. магнетна мешалица (C-MAG HS 7, ИКА, Немачка) са аутоматском регулацијом температуре и термометром (ETS-D6, ИКА, Немачка), рН метар (Eutech instrument, Холандија) и бирета за регулисање рН вредности реакционе смеше у току биотехнолошког поступка хидролизе (Слика 6.1). Ултразвучно и/или термички претретирани хомогенизовани узорци раствора протеина беланцета (одељак 6.3.2), термостатирани су на магнетног мешалици уз константно мешање 15 минута на

оптимальној температури протеазе. Након термостатирања, узорцима је додавањем 0,2 М раствора HCl или 0,2 М раствора NaOH подешена оптимальна рН вредност и потом додата протеаза у количини у којој је масени однос ензим-супстрата ( $E/S$ ) износио 2,5%. Ензимска хидролиза је у зависности од коришћеног протеолитичког ензима за сваки сет експеримената изведена при оптимальним усвојеним условима датим у Табели 6.1. Испитан је утицај различитих комерцијалних протеолитичких ензима на хидролизу протеина беланцета у шаржном реактору, при чему су експерименти изведени применом два различита приступа. Конкретно, ензимске хидролизе вршене су као:

- ❖ једностепене (примена једне комерцијалне ендо-пептидазе) и
- ❖ двостепене (примена две по механизму деловања различите протеазе, тј. једна ендо-пептидаза и једна егзо-пептидаза).



**Слика 6.1.** Шематски приказ експерименталног шаржног реактора за ензимску хидролизу протеина беланцета; а) коришћена ултразвучна сонда и б) реактор са механичким мешањем:

1-стаклени суд, 2, пропелерска мешалица са 4 пропелера повезана са механичком мешалицом, 3-бирета, 4-електрични сензор за дигитално мерење рН вредности, 5-темометар, 6-вентил, 7-база за одржавање константне рН и 8-магнетна мешалица са грејањем.

**Једностепена ензимска хидролиза** изведена је испитивањем утицаја протеолитичких ензима алкаказе, неутразе и папаина на степен хидролизе протеина беланцета, док је **двостепена ензимска хидролиза** као најефикасније технолошко решење за добијање хидролизата тачно дефинисаних својстава изведена при

различитим комбинацијама протеолитичких ензима алкалазе, неутразе и флеворзима. Претходно описан поступак ензимске хидролизе приписује се једноступеном поступку извођења. Двоступена ензимска хидролиза за сваки сет експеримената и комбинацију коришћених протеолитичких ензима (алкалаза и флеворзим, алкалаза и неутраза, флеворзим и алкалаза) вођена је при оптималним реакционим условима за одабране ензиме (Табела 6.1), а поступак извођења у првој фази експеримента еквивалентан је био претходно описаном једноступеном поступку. У поступку двоступене ензимске хидролизе са **алкалазом и флеворзимом** или **алкалазом и неутразом**, хомогенизовани претретирани узорци раствора протеина баланцета прво су хидролизоване алкалазом при оптималним условима до постизања степена хидролизе ~ 18% и/или до истека 45 минута реакције. Потом, рН реакционе смеше подешен је додатком 0,2 М раствора HCl на 7,0 и додат други ензими флеворзим или неутраза у масеном односу  $E/S$  2,5%, а реакције је даље вођена при оптималној температури. У случају извођења хидролизе са **флеворзимом и алкалазом**, хомогенизовани претретирани узорци раствора протеина баланцета прво су делимично хидролизоване флеворзимом при оптималним условима за овај ензим (Табела 6.1). По постизању степена хидролизе 18%, додатком 0,2 М раствора NaOH подешена је рН реакционе смеше на 8,0 и додата алкалаза у количини која одговара активности 2,12 AU (масени однос  $E/S$  = 2,5%).

Приликом праћена тока ензимске хидролизе рН-стат методом, рН реакционе смеше је након додатка протеазе одржаван константним до завршетка реакције. По завршетку хидролизе (након 2-4 сата) и/или током исте (узорковање на сваких 15 минута), протеолитички ензим је инактивиран у свакој реакционој смеси загревањем исте 15 минута на 90 °C. Након дезактивације ензима, узорци су охлађени и центрифугирани на 12,000×g 10 минута на собној температури, како би се уклонили нерастворни протеини и инактивирани ензими. Супернатанти, који представљају смешу пептида, су декантовани и чувани у својству хидролизата на 4 °C за наредне анализе. **Контролни узорак** припремљен је мешањем воденог раствора протеина баланцета, масене концентрације 10% без ултразвучног и термичког претретмана, у реакционом суду на магнетној мешалници при брзини 240 о/min и температури 25±1 °C, након чега је узорак подвргнут ензимској хидролизи вођеној при горе описаним условима. Свака серија ензимске хидролизе изведена је у трипликату.

**Табела 6.1.** Оптимални реакциони услови ензимске хидролизе протеина беланцета за одређене ензиме.

Протеолитички ензими	Декларисана активност ензима	T, °C	pH	Активност ензима у узорцима (U)*
<b>Алкалаза</b> ендопептидаза из <i>Bacillus licheniformis</i>	≥ 2,4 U/g	50	8	2,12
<b>Флеворзим</b> егзо- и ендопептидаза из <i>Aspergillus oryzae</i>	≥ 500 U/g	50	7	450
<b>Неутраза</b> ендопептидаза из <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	≥ 0,8 U/g	45	7	0,76
<b>Папаин**</b> егзо- и ендопептидаза из <i>papaya latex</i> -а	1,5-10 U/mg	55	7	5,00

\* Једна Ансонова јединица (U) дефинисана је као она количина ензима која је, под стандардним условима, потребна за хидролизу уреом денатурисаног хемоглобина при почетној кинетици, тако да ослобођена количина ТСА-растворљивог производа по минути даје исто обојење са Folin-Ciocalteu реагентом као један милнеквивалент тирозина на 25 °C и pH 7,50.

\*\* Непосредно пре употребе и термостатирања папаин се раствара у води и/или пуферу који садржи ~ 10 mM L-цистеин.

### 6.3.5. Праћење тока ензимске хидролизе протеина беланцета

Количина хидролизованых пептидних веза у току ензимског процеса одређена је праћењем и израчунавањем степена хидролизе, а применом неколико различитих метода: pH-стат метода, нинхидринска метода и метода са TNBS киселином.

#### 6.3.5.1. Одређивање степена хидролизе pH-стат методом

Ток ензимског процеса хидролизе протеина беланцета (једноступеног и двоступеног) пратио се pH-стат методом, која се заснива на одржавању константне вредности pH реакционе смеше сталним додавањем одговарајуће количине 0,2 M NaOH. Теоријски, pH-стат метода заснива се на чињеници да се током хидролизе протеина број слободних α-амино и карбоксилних група повећава. Стога, број раскинутих пептидних веза директно је пропорционалан потрошњи базе током титрације.<sup>78</sup> Пошто се у овом случају реакција одвијала у интервалу pH 7 до 8, што је изнад pK вредности амино групе, уколико се не контролише, pH ће опасти током реакције. Крај хидролизе означава моменат када више није неопходно додати базу за подешавање pH вредности. Вођењем ензимске хидролизе на описан начин, **степен хидролизе** (на енгл. degree of hydrolysis - DH) израчунава се према једначини:<sup>78</sup>



$$DH (\%) = \frac{h \cdot 100}{h_{tot}} = \frac{N_b \cdot B \cdot 100}{\alpha \cdot m_p \cdot h_{tot}} \quad (5.3)$$

где су:  $h$  - број еквивалентних пептидних веза хидролизованых у тренутку  $t$ ,  $h_{tot}$  - укупан број пептидних веза у протеинском супстрату  $\text{mmol/g}_{\text{протеина}}$  (7,67  $\text{mmol/g}$  протеина беланцета),  $B$  - утрошак базе у  $\text{cm}^3$ ,  $N_b$  - нормалитет базе,  $\alpha$  - просечан степен дисцијације  $\alpha\text{-NH}_2$  група (вредности калибрационог фактора  $1/\alpha$ , при различитим температурама ензимске хидролизе дате су у Табели 6.2) и  $m_p$  - маса протеина изражена у граммама.

**Табела 6.2.** Вредности калибрационог фактора ( $1/\alpha$ ) за израчунавање степена хидролизе током ензимске хидролизе протеина беланцета праћене рН-стат методом<sup>78</sup>

рН ензимске реакције	Температура ензимске реакције (рК $\alpha\text{-NH}_2$ групе)	
	50 °C (7,1)	60 °C (6,9)
7	2,27	1,79
8	1,13	1,08

#### 6.3.5.2. Одређивање степена хидролизе нинхидринском методом

Одређивање степена хидролизе и праћење тока ензимског процеса хидролизе протеина беланцета (једностепеног и двостепеног) нинхидринском методом захтевало је припрему неколико реагенаса:

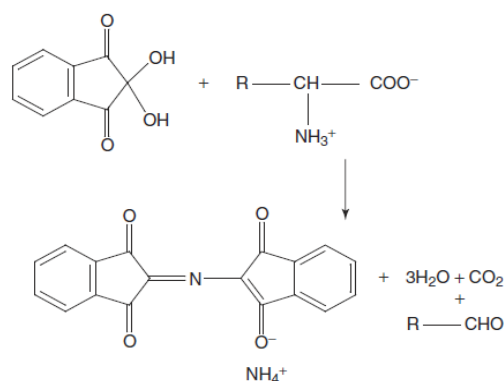
1. Нинхидринског реагенса:
  - ❖ 32 mg калај (II)-хлорида дихидрата је растворено у  $10 \text{ cm}^3$  0,2 М цитратног пуфера рН 5,0
  - ❖ 0,5 g нинхидрина је растворено у  $10 \text{ cm}^3$  диметил сулфооксида
  - ❖ једнаке запреме ова два раствора помешане су непосредно пре употребе за добијање нинхидринског реагенса,
2. 0,12% (w/v) раствора полиетиленгликога моларне масе 6000 Да у дејонизованој води,
3. 2 mM раствора леуцина и 2 mM пролина (обе аминокиселине растворене у дејонизованој води).

Током једностепеног и двостепеног ензимског процеса хидролизе протеина беланцета на сваких 15 минута узорковани су узорци из реакционог суда, а у сваком узорку је одмах дезактивиран ензим и након центрифугирања издвојен супернатант

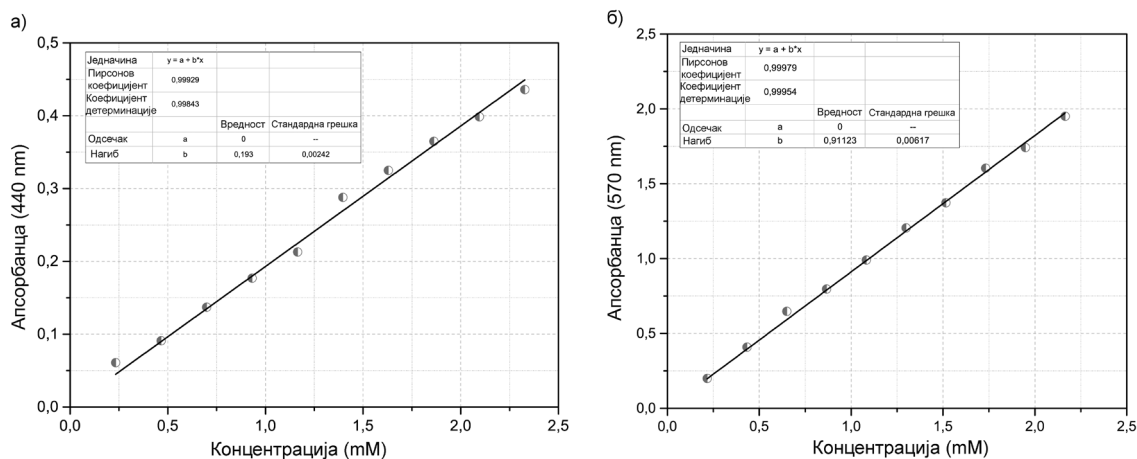
који се као такав користио даље у нинхидринској реакцији на следећи начин. Прво се 0,1 cm<sup>3</sup> узорка реакционе смеше и/или раствора аминокиселина пренесе у епрувету и меша са 0,1 cm<sup>3</sup> раствора полиетилин гликола. Затим, додат је 1 cm<sup>3</sup> нинхидринског реагенса и меша је загревана у воденом купатилу 10 минута на 80 °C. Садржај епрувете је разблажен додавањем 1 cm<sup>3</sup> дејонизоване воде и охлађен, а апсорбанца насталог производа реакције (Слика 6.2) је очитавана спектрофотометријски на 440 и 570 nm. Слепа проба је припремљена на исти начин као и узорак, али је уместо узорка додата дејонизована вода. За конструисање стандардних правах (Слика 6.3) користиле су се пречишћене аминокиселине, пролин и леуцин. Од почетних раствора пролина и леуцина припремљено је шест до десет различитих разблажења. Сваки узорак разблажења користио се у нинхидринској реакцији на начин који је претходно описан. Апсорбанца на којој је очитавана вредности за пролин је 440 nm, а за леуцин 570 nm. **Степен хидролизе** израчунава се према једначини:

$$DH (\%) = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100 \quad (6.4)$$

где су  $h$  - број еквивалентних пептидних веза хидролизованых у тренутку  $t$ ,  $h_{\text{tot}}$  - укупан број пептидних веза у протеинском супстрату у mmol/g протеина (meq/g протеина).



**Слика 6.2.** Реакција нинхидринског реагенса са аминокиселинама – производ реакције даје пурпурно плаво обојење (пролин са нинхидринским реагенсом даје жуто обојен производ).



Слика 6.3. Стандардне праве конструисане за: а) пролин и б) леуцин.

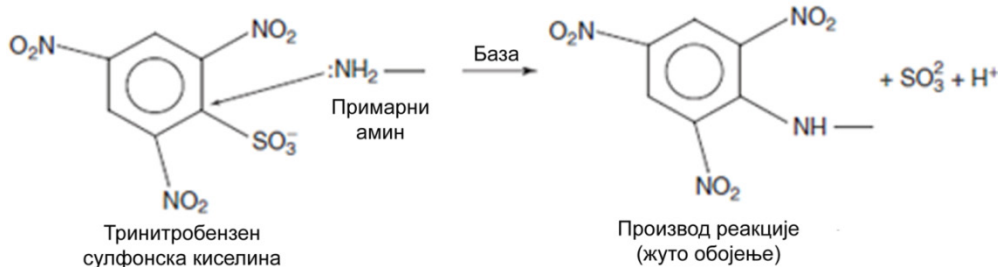
### 6.3.5.3. Одређивање степена хидролизе методом са TNBS киселином

Одређивање степена хидролизе методом са TNBS киселином током извођења једноступеног и двоступеног ензимског процеса хидролизе протеина белацета захтевало је узорковање из реакционог суда на сваких 15 минута (0,25 cm<sup>3</sup>). У сваком узорку одмах је дезактивиран ензим додатком 2 cm<sup>3</sup> 1 % (w/w) воденог раствора натријум-додецил сулфата, при чему је инактивација изведена у воденом купатилу са мешањем 15 минута на 75 °C. Затим, у епрувете је пипетом пренесено 0,25 cm<sup>3</sup> од сваког узорка и додато по 2 cm<sup>3</sup> 0,2 М фосфатног пуфера (pH 8,2) и 2 cm<sup>3</sup> 0,1 % (v/v) воденог раствора тринитробензен сулфонске киселине. Реакциона смеша је промешана на вортексу и инкубирана у воденом купатилу са мешањем 60 минута на 50 °C. Слепа проба је припремљена на исти начин као и узорак, али је уместо узорка коришћена дејонизована вода. По истеку инкубационог времена, реакција је заустављена додавањем 0,1 М раствор HCl (4 cm<sup>3</sup>), а апсорбанца насталог производа очитана је спектрофотометријски на 340 nm.

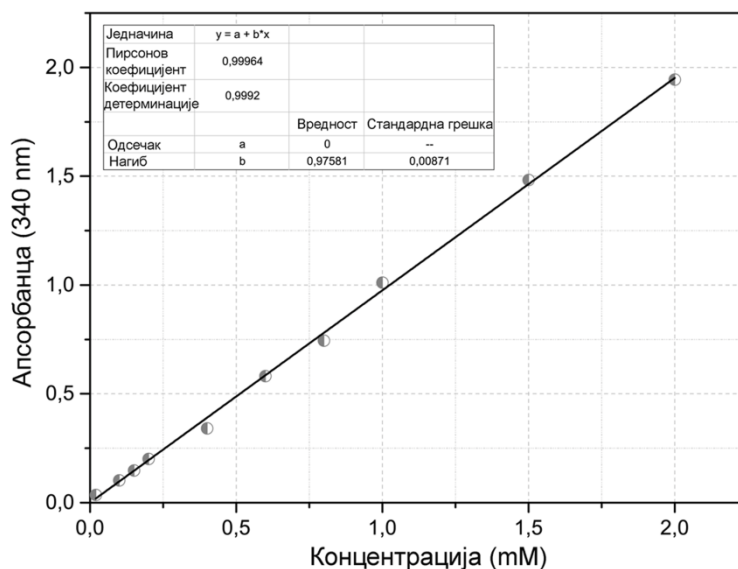
Теоријски, TNBS киселина реагује се аминокиселинама у непротонованом облику дајући производ жутог обојења (Слика 6.4). Са примарним аминима TNBS киселина реагује у присуству слабих база и снижавањем pH смеше долази до заустављања реакције. За конструисање стандардне праве (Слика 6.5) користила се пречишћена амининокиселина леуцин. Од почетног раствора леуцина припремљено је шест до десет различитих разблажења. Сваки узорак разблажења леуцина (0,25 cm<sup>3</sup>) користио се у реакцији са TNBS киселином на начин који је претходно описан. **Степен хидролизе** израчунава се према једначини:

$$DH (\%) = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \cdot 100 \quad (6.5)$$

где су  $h$  - број еквивалентних пептиних веза хидролизованых у тренутку  $t$ ,  $h_{\text{tot}}$  - укупан број пептидних веза у протеинском супстрату у mmol/g протеина (meq/g протеина).



Слика 6.4. Реакција тринитробензен сулфонске киселине са примарним аминима.



Слика 6.5. Стандардна права конструисана за леуцин.

### 6.3.6. Ензимска хидролиза протеина беланцета у континуалном реакторском систему повезаним са мембранском сепарационом јединицом

Ензимска хидролиза протеина беланцета изведена је у континуалном реакторском систему са реакционим судом капацитета 600 cm<sup>3</sup> и механичким мешањем оствареним коришћењем пропелерске мешалице са 4 пропелера (Heidolph RZR 2020, Немачка) при брзини мешања 240 o/min. Додатно, апаратуру реакторског система чинили су: суд са супстратом (ултразвучно или термички претретирани портеини беланцета) који је континуално довођен перисталтичком пумпом у реакциони суд, грејна јединица (C-MAG HS 7, ИКА, Немачка) са аутоматском регулацијом температуре и термометром (ETS-D6, ИКА, Немачка), рН метар (Eutech

instrument, Холандија), бирета за регулисање рН вредности реакционе смеше у току биотехнолошког поступка хидролизе, мембранска сепарациона јединица са полиетиленсулфонском мембраном величине пора 10 kDa (активне површине 50 cm<sup>2</sup>, Vivaflow 50 10000MWCO PES, Sartorius Stedim Biotech, Гетинген, Република Немачка) и суд за сакупљање пермеата (Слика 6.6). Ултразвучно и/или термички претретирани хомогенизовани узорци раствора протеина баланцета (одељак 6.3.2), термостатирани су на магнетног мешалици уз константно мешање 15 минута на оптималној температури алкалазе. Након термостатирања, узорцима је додавањем 0,2 М раствора HCl или 0,2 М раствора NaOH подешена оптимална рН вредност и потом додата алкалаза у реакциони суд у количини у којој је масени однос ензим-супстрата (E/S) износио 2,5%.

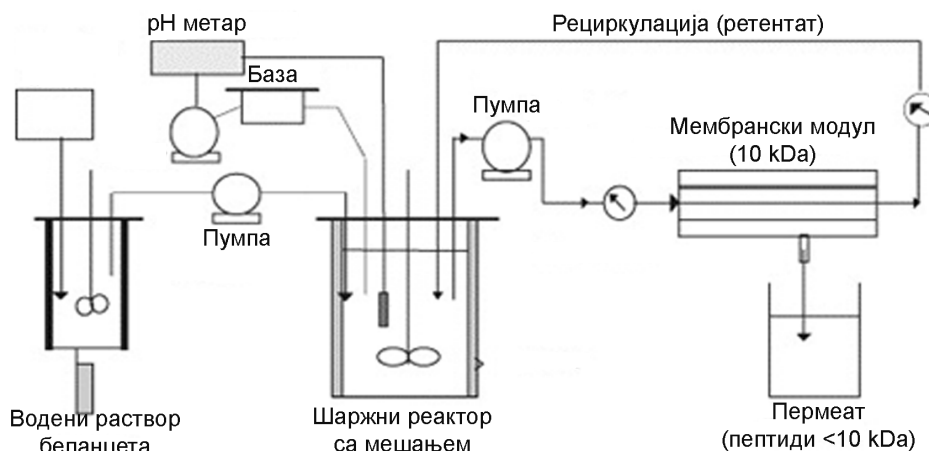
Ензимска хидролиза одвијала се у реакционом суду из кога је одмах по додавању алкалазе реакциона смеша увођена у мембрански модул у коме је омогућено раздавање молекула протеина и/или пептида по њивој молекулској маси. Протеини и/или пептиди молекулске масе >10 kDa рециркулацијом враћани су у реакциони суд, док је пермеат са молекулима пептида молекулске масе <10 kDa сакупљан у чистом суду и чуван до наредних анализа на 4 °C. Проток довођења нехидролизованог супстрата из суда са супстратом у реакциони суд био је једнак протоку пермеата (2,1 cm<sup>3</sup>/min) тако да се запремина одржавала константном. Такође, проток реакционе смеше био је 2,1 cm<sup>3</sup>/min.

Ток ензимске хидролизе праћен је рН-стат методом која је подразумевала одржавање константне рН вредности реакционе смеше додавањем одговарајуће количине 0,2 М раствора NaOH на сваких 15 минута. Крај хидролизе означавао је тренутак када није било неопходно додавати базу за подешавање оптималне рН, тј. када је рН вредности 8,0 била иста након два узастопна мерења без додавања базе. Степен хидролизе израчунава се према једначини аналогној једначини за ток хидролизе у шаржном реакторском систему:<sup>190</sup>

$$DH (\%) = \frac{\left(M_B - V_p \cdot \frac{K_w}{10^{-pH}}\right)^{\frac{1}{\alpha}}}{(V_r + V_p) \cdot S_f \cdot h_{tot}} \cdot 100 \quad (6.6)$$

где су:  $M_B$  - утрошена количина базе потребна за одржавање константне рН (mol),  $V_p$  - запремина сакупљеног пермеата (cm<sup>3</sup>),  $K_w$  - јонски производ воде ( $5,8 \times 10^{-14}$  на температури 50 °C),  $\alpha$  - просечан степен дисоцијације  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> (Табела 6.2),  $V_r$  - запремина реакционе смеше (cm<sup>3</sup>),  $S_f$  - концентрације протеина напојне смеше

( $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) и  $h_{\text{tot}}$  - укупан број пептидних веза у протеинском супстрату  $\text{mmol}/\text{g}_{\text{proteina}}$  ( $7,67 \text{ mmol}/\text{g}$  протеина беланцета).



**Слика 6.6.** Шематски приказ експерименталног континуалног реакторског система за ензимску хидролизу протеина беланцета.

### 6.3.7. Кинетика хидролизе протеина беланцета у шаржном реактору са механичким мешањем

Кинетичка студија, односно испитивања различитих кинетичких модела за описивање хидролизе протеина беланцета претходно претретираних високом температуром или ултразвучним таласима изведена су на експерименталним резултатима добијеним при истим реакционим условима у шаржном реактору са механичким мешањем. Одговарајуће мешање постигнуто је употребом пропелерске мешалице са четири пропелера и брзини  $240 \text{ o}/\text{min}$ . Да би се утврдио тачан реакциони механизам ензимске хидролизе протеина беланцета приликом анализе добијених експерименталних резултата у обзир је узет реакциони механизам без инхибиције-реакција нултог реда и реакциони механизам са дезактивацијом ензима и инхибицијом супстратом-реакција другог реда. Како је реакциони механизам без инхибиције показао лоше слагање са експерименталним резултатима за даљу анализу и тумачење експерименталних резултата добијених за различите протеолитичке ензиме, као и за комплетну кинетичку студију употребљен је полу-емпиријски кинетички модел који узима у обзир дезактивацију ензима и инхибицију супстратом у вишку у складу са кинетиком другог реда.

Пошто су се у прелиминарним резултатима са аспекта унапређења антиоксидативне активности хидролизата протеина беланцета као најбољи показали хидролизати припремљени у једностапеном поступку ензимске хидролизе

катализоване алкалазом и у двостепеном поступку катализованом алкалазом и флеворзимом, кинетичка студија изведена је при оптималним реакционим условима за дејство алкалазе и флеворзима (Табела 6.1). Почетна кинетика реакције хидролизе испитана је при различитим оперативним условима варирањем почетних концентрација ензима и супстрата. Одређивање енергије активације реакције и енергије дезактивације ензима у реакционом систему при претходно усвојеним оптималним концентрацијама ензима и супстрата изведено је варирањем температуре реакције хидролизе (45, 50, 55 и 65 °C).

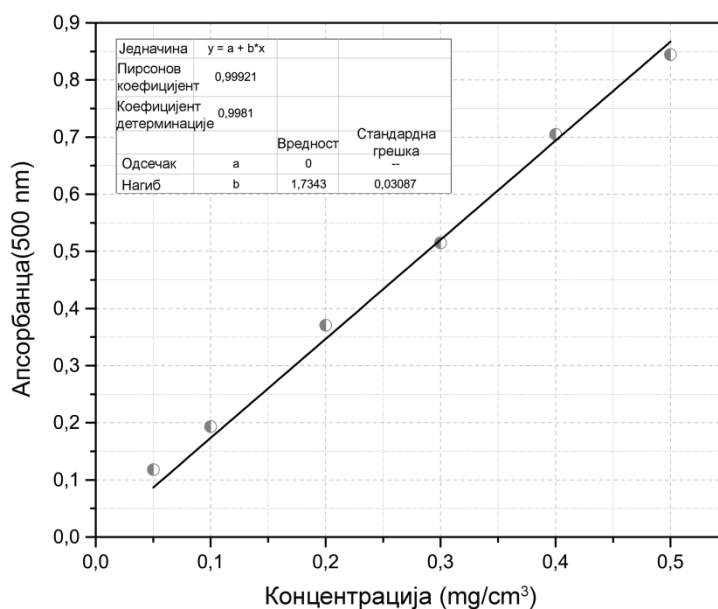
### 6.3.8. Лоријева (Lowry) метода за одређивање садржаја протеина

Одређивање садржаја протеина у узорцима хидролизата беланцета методом по Лорију (Lowry) заснива се на две консекутивне реакције. Прва реакција у реакционом механизму јесте редукција јона  $\text{Cu}^{2+}$  у алкалној средини који граде комплекс са атомима азота из пептидних веза протеина. Друга реакција представља редукцију Фолиновог реагенса, који садржи фосфомолибденску и фосфоволфрамову киселину, новонасталом комплексом јона  $\text{Cu}^{2+}$ -пептидна веза, односно бочним остацима тирозина, триптофана и цистеина, у молибден-волфрам плаво. Интензитет плавог обојења зависи од концентрације протеина и мери се спектрофотометријски читавањем апсорбанце на 720 nm или ако је вредност превисока (>3 као што је било у овом истраживању) на 500 nm. Садржај протеина у анализираним узорцима одређен је помоћу стандардне праве конструисане за стандардни раствор протеина (албумин из говеђег серума-BSA). За одређивање садржаја протеина овом методом припремљени су следећи реагенси:

- ❖ Реагенс А: 2% раствор натријум-карбоната у 0,1М натријум-хидроксида,
- ❖ Реагенс Б: 1% раствор бакар(II)-сулфата припремљен у дејонизованој води,
- ❖ Реагенс Ц: 2% раствор калијум-натријум-тартарата припремљен у дејонизованој води,
- ❖ Реагенс Д: припремљен је мешањем 1 cm<sup>3</sup> реагенса Б и 1 cm<sup>3</sup> реагенса Ц, након чега су помешани реагенси допуњени реагенсом А до 100 cm<sup>3</sup> укупне запремине. Овај реагенс припрема се непосредно пред употребу.
- ❖ Реагенс Ф: 1 запремина *Folin-Ciocalteu* реагенса (2М) се разблажује са 2 запремине дејонизоване воде и тако припремљен Фолинов реагенс се увек користи свеж.

Поступак одређивања садржаја протеина у анализираним узорцима био је следећи: у  $1 \text{ cm}^3$  узорка и/или разблаженог узорка дадато је  $2 \text{ cm}^3$  реагенса Д уз интензивно мешање на вортексу и раствори су инкубирани 10 минута на собној температури. После инкубације додато је  $0,2 \text{ cm}^3$  реагенса Ф уз интензивно мешање и раствори су инкубирани још 45 минута на собној температури, а по истеку инкубационог времена промена апсорбанце очитавана је на  $500 \text{ nm}$ . Слепа проба је уместо  $1 \text{ cm}^3$  узорка садржала  $1 \text{ cm}^3$  дејонизоване воде.

Стандардна права (Слика 6.7) конструисана је на основу вредности апсорбанци добијених за растворе стандардног раствора BSA концентрације 0,1 до  $0,5 \text{ mg/cm}^3$  у којима је садржај протеина одређен по горе описаној методи.<sup>194</sup>



Слика 6.7. Стандардна права за одређивање садржаја протеина.

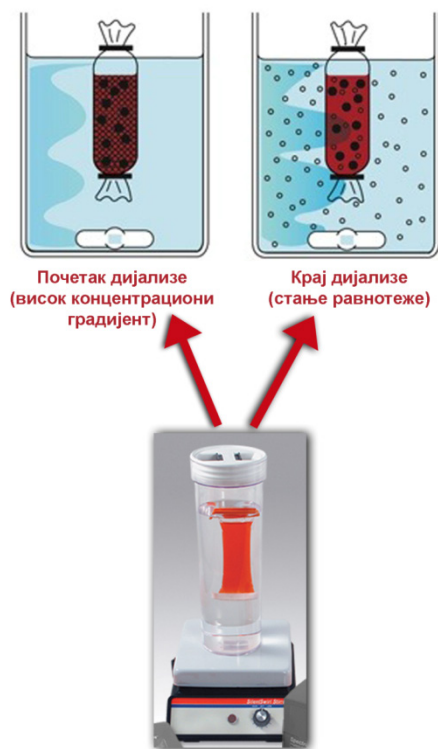
### 6.3.9. Дијализа хидролизата протеина беланцета

У овом истраживању ензимска хидролиза протеина беланцета често је вођена рН-стат методом што је подразумевало додавање натријум-хидроксида зарад одржавања константне рН вредности реакције, што је последично довело до реакције неутрализације, односно настанка соли. Како би се уклонили молекули соли из крајњих протеинских хидролизата и тиме олакшале наредне фазе пречишћавања и изоловања пептидних фракција, након декантовања хидролизата вршило се одсољавање дијализом користећи целулозна црева за дијализу величине



пора 100-500 Da (*на енгл. molecular weight cut-off-MWCO*; произвођача Spectum Europe B.V.) спречавајући на тај начин губитак пептида малих молекулских маса.

Поступак дијализе протеинских хидролизата састојао се из неколико корака. Најпре су полупропустљивеа целуозна црева затворена са доње стране пгипалањком за црева, а потом напуњена узорком. Такође, са горње стране црево је осигурано затварањем, баш како је илустровано на Слици 6.8. Напуњено црево поставља се пажљиво у посуду са дејонизованом водом, постављеној на магнетној мешалици. Након сат времена инкубације на 4 °С, уз константно мешање на магнетној мешалици, и успостављања концентрационе равнотеже, дејонизована вода је замењена свежом. Црева са узорком су поново постављена у посуду са свежом водом и остављена 24 сата, уз напомену да је на сваких 6-8 сати вода мењана. Узорци након дијализе коришћени су у наредним фазама пречишћавања и изоловања пептида.



Слика 6.8. Шематски приказ процеса дијализе.

### 6.3.10. Одређиване степена хидрофобности површине молекула протеина беланцета и њихове агрегације

Утицај процеса соникације на карактеристике честица протеина беланцета испитан је са аспекта расподеле величине честица агрегираних молекула и са аспекта површних карактеристика: укупног наелектрисања, тј. зета-потенцијала и

површинске хидрофобности. За мерење степена денатурације протеина употребљена је техника мерења количине укупних и реактивних сулфхидрилних (SH) група.

#### 6.3.10.1. Мерење средње величине честица и зета потенцијала

**Средња величина честица, расподела величина честица по интензитету,** као и **полидисперзни индекс (PdI)** колоидних раствора протеина беланцета одређени су непосредно након термичког и ултразвучног претретмана док су агрегиране честице протеина и даље биле дисперговане у дисперзном средству, примењујући технику мерења динамичког расипања светлости (*на енгл.* dynamic light scattering-DLC). Мерења су изведена на уређају Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Вустершир, Велика Британија), повезаним са софтверским пакетом Mastersizer 2000 верзија 6.12. Као дисперзно средство у коме су дисперговане честице беланцета, у овом истраживању користила се дестилована вода, а коришћене вредности реолошких карактеристика овог дисперзног систем биле су: индекс дефракције 1,354 и индекс апсорптивности 0,001. Коришћен инструмент има распон мерења од 0,3 nm-10  $\mu$ m, а принцип мерења средње величине честица заснива се на проласку фокусираног снопа светлости и расејавању светлости под углом од  $173^\circ$  на  $25 \pm 0,1$  °C. Уређај садржи He-Ne црвени извор светлости таласне дужине 633 nm, смештен у осни инструмента. Светлост коју честице расипају сабира се помоћу Фуријеовог сочива, а подаци о интензитету расуте светлости се шаљу до детектора и користе за рачунање величина честица.

Експериментални подаци представљени у истраживању средња су вредност од најмање осам узастопних мерења, при чему свака крива/мерење представља средњи резултат од 14 мерења. Вредност средњег пречника агрегираних молекула протеина беланцета,  $d$ , представља хидродинамички пречник сфере (тј. пречник честице са хидратационим омотачем) која има исту запремину као честица и представља средњу вредност пречника свих мерених честица.

На истом уређају извршена су и мерења **зета ( $\zeta$ )-потенцијала** претретираних узорака протеина беланцета, а за обраду резултата коришћен је софтверски пакет Zetasizer (верзија 6.12). Мерење зета-потенцијала извршено је применом технике електрофоретске покретљивости, којом се мери кретање честица у примењеном електричном пољу. Уређај је опремљеним са МРТ-2 аутотитратом и универзалном

ћелијом у коју се смешта кивета са узорком за анализу. Јединица за титрацију повезана је капиларним системом и перисталтичком пумпом са капиларном ћелијом. Јачина примењеног електричног поља у току мерења износила је 20 V/cm. С обзиром да је зета-потенцијал функција наелектрисања на површини честица, врсте и јонске јачине електролита присутних у дисперзионом систему, мерења за све испитиване узорке протеина беланцета изведена су у дестилованој води. Диелектрична константа је у том случају износила 65 на  $25 \pm 0,1$  °C (300-400 MHz), а вискозност 10 mPa·s. Непосредно пре аутоматске титрације и мерења, сви узорци протеина беланцета су филитритани кроз стерилне филтере са одговарајућом величином пора 0,22  $\mu$ m. Десет узастопних мерења је изведено приликом једног мерења зета-потенцијала, а сваки узорак је анализиран три пута и приказани подаци су средња вредност тих мерења. **Зета-потенцијал** применом електрофоретске покретљивости израчунат је према следећој једначини:<sup>195</sup>

$$\zeta = \frac{\mu \cdot \eta}{\varepsilon} \quad (6.7)$$

где је:  $\zeta$  зета потенцијал,  $\mu$  је покретљивост,  $\eta$  је вискозност раствора, а  $\varepsilon$  је диелектрична константа дисперзног средства.



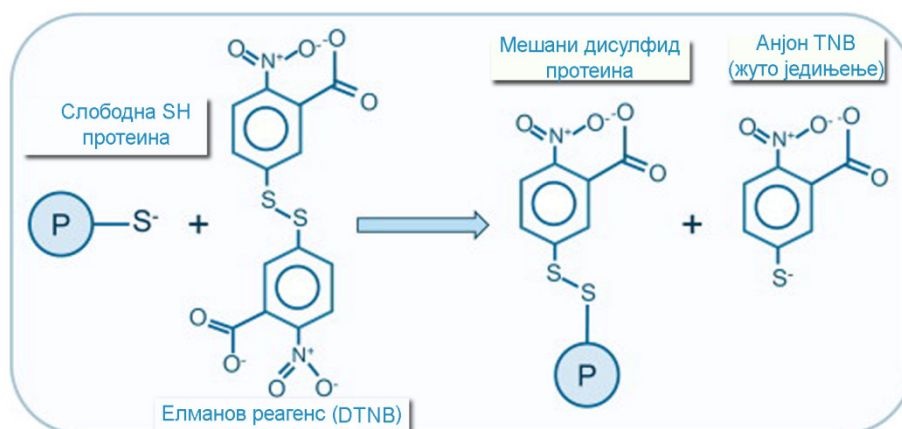
**Слика 6.9.** а) Уређај Zetasizer Nano ZS коришћен за мерење средње величине честица, расподеле величина честица по интензитету и зета потенцијала; б) Универзална капиларна ћелија за мерење зета потенцијала.

### 6.3.10.2. Садржај укупних и реактивних сулфхидрилних група

У циљу потврђивања утицаја ултразвучних претретмана на структурне промена са аспекта степена денатурације, дејство ултразвучних таласа на промене садржаја укупних и реактивних сулфхидрилних група разблажених водених раствора протеина беланцета одређен је спектофотометријски према Елмановој (Ellman) процедури користећи 5,5'-дитиобис-(2-нитробензоеву киселину), тј. DTNB која брзо и специфично реагује са слободним сулфхидрилним групама у молекулу протеина.

Том приликом DTNB се редукује и ослобађа се један еквивалент жутог хомогеног анјона 5-тио-2-нитробензојеве киселине, тј. TNB чији се апсорпциони максимум очитава на 412 nm (Слика 6.10). Анализа је изведена према методи Шимада (Shimada) и сарадника са незнатним изменама.<sup>196</sup>

Узорци протеина беланцета (10%) су за мерење **садржаја реактивних сулхидрилних група** разблажени стандардним пуфером чија је рН вредност била 8 до концентрације 0,05%. Стандардни пуфер припремљен је растварањем следећих једињења у количини која одговара концентрацијама: 0,086 М Tris, 0,09 М глицин и 4 mM Na<sub>2</sub>EDTA. Припремљени разблажени узорци одмах су центрифугирани на 10000 о/min 20 минута на собној температури ради уклањања нерастворних протеина. Након декантовања 2,5 cm<sup>3</sup> супернатанта је одвојено и коришћено за реакцију са DTNB, од Елмановим реагенсом. Наиме, у 2,5 cm<sup>3</sup> супернатанта додато је 0,025 cm<sup>3</sup> Елмановог реагенса раствореног стандардним пуфером до концентрације 4 mg/cm<sup>3</sup> и интензивно вортексирано. По истеку 15 минута инкубације на собној температури промена апсорбанце очитавана је на 412 nm. **Садржај укупних сулфхидрилних група** у узорцима одређен је на потпуно идентичан начин као и реактивних, само је у овом случају уместо стандардног пуфера коришћен денатуришући пуфер рН 8,0. Денатуришући пуфер припремљен је растварањем следећих једињења у количини која одговара концентрацијама: 0,086 М Tris, 0,09 М глицин, 4 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 8 М раствор урее и 0,5 % натријум-додецил-сулфата. Упоредо са узорцима припремљене су и следеће пробе које су уместо 2,5 cm<sup>3</sup> супернатанта са протеинима садржале 2,5 cm<sup>3</sup> стандардног или денатуришућег пуфера.



**Слика 6.10.** Реакциони механизам редуције Елмановог реагенса (5,5'-дитиобис-(2-нитробензојеве киселине) у присуству слободних сулхидрилних група протеина.

### 6.3.10.3. Мерење површинске хидрофобности

Мерење површинске хидрофобности ултразвучно претретираних протеина беланцета, њихових биолошки активних протеинских хидролизата и/или пептидних фракција извршено је применом флуоресцентне пробе 8-анилино-1-нафталенсулфонске киселине према методи описаној у истраживању Катоа (Kato) и Накаиа (Nakai)<sup>197</sup> са незнатним изменама. Промена површинске хидрофобности свих узорака праћена је везивањем хидрофобне флуоресцентне пробе за постојеће хидрофобне регионе на површини молекула протеина путем неполарне анилин-нафталенске групе, што је испраћено повећањем индекса флуоресценције молекула (*на енгл.* fluorescence index). Серије разблажења дисперзних узорака протеина беланцета и/или протеинских хидролизата и пептидних фракција припремљене су са 0,1 М фосфатним пуфером (рН 7) у опсегу концентрација 0,0025-0,2% (*v/v*). Припремљена разблажења пренесена су микопипетом у кварцну кивету (1,393 cm<sup>3</sup>) и индекс флуоресценције измерен је на 25 °С користећи Horiba FluoroMax-4 спектрофлуориметар (произвођача Horiba Jobin Yvon GmbH, Немачка) при таласној дужини ексцитације 360 nm (ексцитациони прорез решетке *на енгл.* excitation slit био је 2,5 nm), таласној дужини емисије 480 nm (емисиони прорез решетке *на енгл.* emission slit био је 2,5 nm) и брзини снимања 10 nm/s. Затим, у кварцне кивете са раствором протеина додато је 0,007 cm<sup>3</sup> 8 mM раствора флуоресцентне пробе ANS, припремљене непосредно пре употребе у 0,1 М фосфатном пуферу рН 7, и индекс флуоресценције при истим параметрима ексцитације и емисије поново је прочитан. Раствор флуоресцентне пробе ANS умотан је алуминијумском фолијом како би се спречило дуже излагање светлости и чуван је на собној температури.

Површинска хидрофобност израчуната је као нагиб праве конструисане прањем нормализованих вредности релативног индекса флуоресценције у функцији концентрације протеина, а изражена је као средња вредност три мерења за сваки узорак. У свим случајевима, вредности коефицијента детерминације током линеарне регресије биле су веће од 0,95, па је било могуће користити добијене зависности за израчунавање површинске хидрофобности. Релативан индекс флуоресценције израчунат је одузимањем прочитаних вредности за разблажене узорке (*на енгл.* single point) од вредности прочитаних у реакцији разблажених узорака са флуоресцентном пробом. Вредности су нормализоване на вредност интензитета флуоресцентне пробе.

### 6.3.11. Расподела молекулских маса протеинских хидролизата беланцета применом трицин-SDS-PAGE електрофорезе

**Трицин-SDS-PAGE гел електрофореза** (*на енгл.* tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) је једнодимензионална електрофоретска техника посебно развијена за раздвајање протеина и пептида малих молекулских маса (< 30 kDa). За разлику од класичне SDS-PAGE електрофорезе по Лемлију (Laemmli),<sup>198</sup> која се темељи на употреби пуфера који садржи трис(хидроксиметил)аминометан (*на енгл.* Tris) и глицин, трицин-SDS-PAGE користи пуфер који уместо глицина садржи трицин. Трицин је *на енгл.* zwitter јонска аминокиселина са пуферирајућим подручјем од рН 7,4. Укупно негативно наелектрисање трицина веће је од негативног наелектрисања глицина због чега се трицин брже креће, при чему његова велика јонска јачина узрокује веће покретање јона, а мање покретање протеина што управо олакшава раздвајање протеина мале молекулске масе.<sup>199</sup>

У циљу одређивања ефикасности ензимске хидролизе ултразвучно и термички претретираних узорак нативних протеина беланцета, изведене једноступеним поступком у шаржном реактру применом енто-пептидазе алкалазе, извршено је раздвајање протеинских хидролизата по молекулској маси применом трицин-SDS-PAGE гел електрофорезе, како је описано по протоколу описаним у методама Шегра (Schägger)<sup>200-201</sup> са незнатним изменама. За прецизнију расподелу молекулских маса и постизање боље резолуције проучаваних протеинских хидролизата у опсегу пептида 1-100 kDa на једном гелу коришћена је дисконтинуална гел електрофореза са 4% полиакриламидним гелом за концентровање и гелом за раздвајање (10% полиакриламида) са додатком „spacer“ гела у Hoefer Ruby веритикалном систему (GE Healthcare Life Sciences, САД). Раздвајање узорак пептида применом трицин-SDS-PAGE извршено је применом константног напона (90 V) током ноћи. По завршетку електрофорентског раздвајања гел је бојен раствореом боје Coomassie Brilliant Blue R-250 (Thermo Fischer Scientific, Волтам, Масачусетс, САД), затим обезбојаван, скениран и пакован у фолију. Комерцијални стандарди за електрофорезу познатих молекулских маса широког спектра (14,4-116 kDa, Thermo scientific, Литванија) коришћени су за одређивање молекулских маса свих извојених трака на гелу за појединачне узорке протеина. Стандарди су садржали следеће протеинске молекуле: β-галактозидазу (116 kDa), албумин из говеђег серума (66,2 kDa), овалбумин (45,0

kDa), лактат-дехидрогеназу (35,0 kDa), REase Bsp98I (25,0 kDa),  $\beta$ -лактоглобулин (18,4 kDa) и лизозим (14,4 kDa). Процедура извођења електрофорезе састојала се у припреми различитих раствора и пуфера, па је подељена ради јасноће у неколико фаза (Табеле 6.3, 6.4, 6.5 и 6.6):

1. припрема раствора за прављење гелова,
2. припрема пуфера за електрофорезу са трицином и пуфера за узорке,
3. припрема гелова,
4. припрема раствора за бојење и обезбојавање гелова.

**Табела 6.3.** Рецептатура за припрему раствора потребних за припрему гелова.

<b>Раствор акриламид:бисакриламида (АБ-3)</b>	
Акриламид	48,0 g
Бисакриламид	1,5 g
Допунити дестилованом водом до 100 cm <sup>3</sup>	
Начин чувања: у тамној боци на 7-10 °C до 4 месеца, јер на 4 °C долази до кристализације	
<b>Раствор акриламид:бисакриламида (АБ-6)</b>	
Акриламид	46,5 g
Бисакриламид	3,0 g
Допунити дестилованом водом до 100 cm <sup>3</sup>	
Начин чувања: у тамној боци на 7-10 °C до 4 месеца, јер на 4 °C долази до кристализације	
<b>10% амонијум-персулфат (APS)</b>	
Амонијум-персулфат	0,1 g
Дестилована вода	10 cm <sup>3</sup>
Начин чувања: у тамној боци на 4°C до 4 месеца	
<b>2x Tris-HCl пуфер за узорке (0,5 M)</b>	
Трис(хидроксиетил)аминометан–Tris	3 g
Дестилована вода	50 cm <sup>3</sup>
Подесити рН на 6,8 додатком HCl	
Начин чувања: у тамној боци на 4°C до 4 месеца	
<b>Раствор n-бутанола</b>	
n-бутанол	50 cm <sup>3</sup>
Дестилована вода	5 cm <sup>3</sup>
Начин чувања: на собној температури, неограничено	

**Табела 6.4.** Рецептатура за припрему пуфера за електрофорезу са трицином и пуфера за узорке протена

Пуфер за узорке (0,125 M)			
2x Tris-HCl пуфер	2,5 cm <sup>3</sup>		
Глицерол	2,0 cm <sup>3</sup>		
10% раствор SDS-а	4,0 cm <sup>3</sup>		
5% раствор бромфенол плавог	0,40 cm <sup>3</sup>		
1 M раствор дитиотреитола	2,0 cm <sup>3</sup>		
Напомена: Разлити у епендорфице по 0,5 cm <sup>3</sup> и тако чувати у замрзивачу до употребе.			
Пуфери за електрофорезу			
Реагенси	Анодни пуфер (10x)	Катодни пуфер (10x)	Пуфер за гел (3x)
Трис(хидроксиметил)аминометан–Tris	1,0 M	1,0 M	3,0 M
Трицин	/	1,0 M	/
HCl	0,225 M	/	1,0 M
SDS	/	1%	0,3%
pH	8,90	~ 8,25	8,45
Напомена: растворе држати на собној температури; pH вредност катодног пуфера се не подешава и идеална вредност је око 8,25.			

**Табела 6.5.** Рецептатура за припрему раствора за бојење и обезбојавање гелова.

Реагенси	Раствор за бојење	Раствор за обезбојавање
Метанол	125 cm <sup>3</sup>	100 cm <sup>3</sup>
Глацијална сирћетна киселина	25 cm <sup>3</sup>	100 cm <sup>3</sup>
Плава боја (на енгл. Coomassie Brilliant Blue R-250)	0,25 g	/
Дестилована вода	до 100 cm <sup>3</sup>	до 1000 cm <sup>3</sup>
Начин чувања: оба раствора припремати непосредо пред употребу		



**Табела 6.6.** Рецептатура за припрему гелова за раздвајање, концентровање и „spacer“ гела.

Реагенси	4% гел за концентровање	10% „spacer“ гел	10% гел за раздвајање
Раствор АБ-6	1,0 cm <sup>3</sup>	/	12,0 cm <sup>3</sup>
Раствор АБ-3	/	2,0 cm <sup>3</sup>	/
Пуфер за гел (3x)	3 cm <sup>3</sup>	3,3 cm <sup>3</sup>	20 cm <sup>3</sup>
Глицерол	/	/	6,0 cm <sup>3</sup>
Дестилована вода (додата)	8 cm <sup>3</sup>	4,7 cm <sup>3</sup>	22 cm <sup>3</sup>
Гелови полимеризују додавањем:			
10% раствор APS	0,090 cm <sup>3</sup>	0,050 cm <sup>3</sup>	0,300 cm <sup>3</sup>
TEMED (тетраметилетилендиамин)	0,009 cm <sup>3</sup>	0,005 cm <sup>3</sup>	0,030 cm <sup>3</sup>
Одмах по додавању TEMED-а промешати нежно и пажљиво сипати гел између плоча да се не би створили мехурићи ваздуха.			

**Протокол:**

Након припреме свих потребних раствора, прво је, међу очишћеним и исправно причвршћеним стакленим плочама постављених усправно на сталак, пажљиво наливен гел за раздвајање. Слој раствора бутанола и воде додат је да би се изравнала површина гела и уклонили мехурићи. Сачекано је сат времена да се изврши полимеризација гела, па је раствор бутанола и воде одливен и гел испран пар пута дестилованом водом. После испирања додат је 10% „spacer“ гел и сачекано је 20 минута да овај танак слој полимеризује. По завршетку полимеризације, наливен је гел за концентровање и постављен је чешаљ како би се направио простор за наношење узорака. Након сат времена, када је завршена полимеризација гела, чешаљ је извађен водећи рачуна да се бунарчићи не поремете, а маркером је означен ниво сваког као и бунарчић за први узорак. Припремљени узорци протеинских хидролизата и стандарди, 10-30 и 20  $\mu$ l, редом, нанесени су микрошплетом у формиране бунарчиће. Узорци протеинских хидролизата непоредно пре наношења на гел припремљени су мешањем са пуфером за узорке у односу 1:1 у епендорфицама и инкубирани на 37 °C 15 минута. Плоче су затим извађене из сталака и постављене у каду за електрофорезу, а када је напуњена пуфером за електрофорезу тако да је анодни пуфер испуњавао део у коме налази анода, а катодни пуфер део где је катода. По затварању, систем је прикључен на извор струје, електрофореза покренута подешавањем почетног напона од 30 V који је одржаван све док узорци у потпуности нису ушли у гел за концентровање. За раздвајање напон

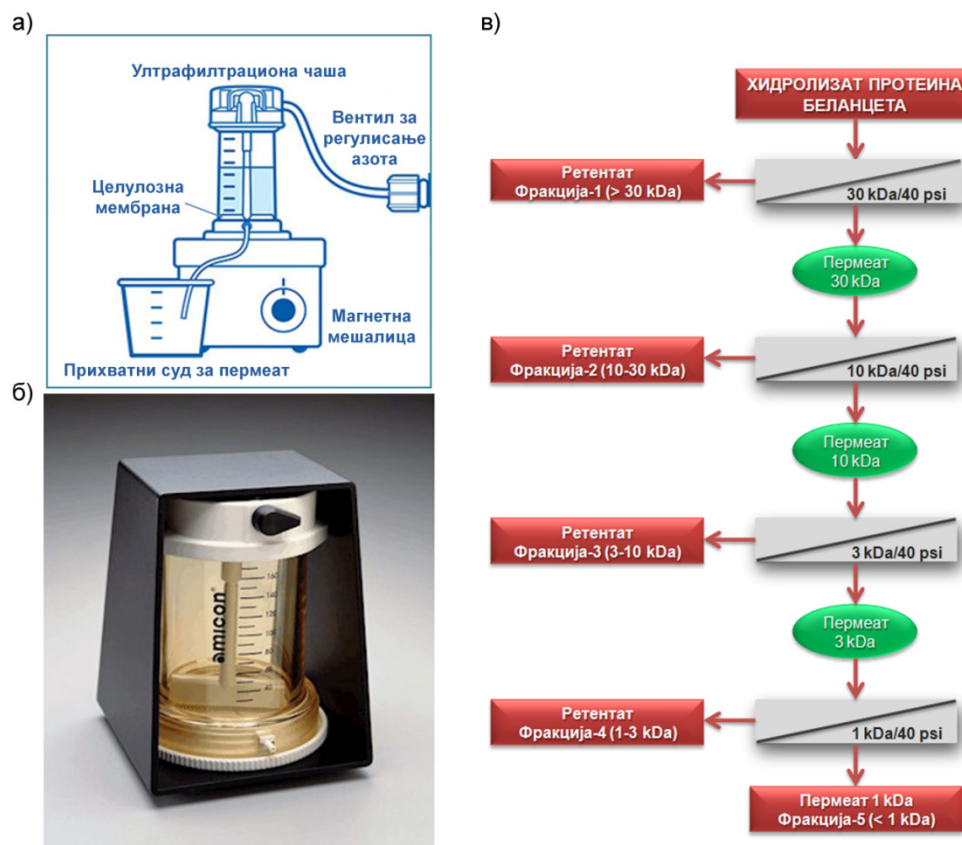
је повећан на 90 V и одржаван је константним током ноћи. Процес раздвајања протеина прекинут је оног тренутка када се видљиви траг боје налазио на 1,5 cm од краја гела. Гел је потопљен у раствор за бојење и остављен око 2-3 сата да се боји. Након бојења, вршено је његово обезбојавање ради уклањања вишка боје користећи раствор за обезбојавање, а у циљу уочавања протеинских трака. Обезбојавање је вршено током 24 сата уз мењање раствора на сваких 3-4 сата.

### 6.3.12. Ультрафилтрационо фракционисање хидролизата нативних протеина беланцета

Хидролизати протеина беланцета припремљени једностепеним технолошким поступком са алкалазом непосредно после ултразвучног и термичког претремана нативних протеина беланцета, са степеном хидролизе 28%, развојени су на фракције пептида мањих молекулских маса применом ультрафилтрационих мембрана изграђених на бази регенерисане целулозе (Millipore Corporation, Bedford, Масачусетс, САД). Ультрафилтрационе мембране различитих величина пора 30, 10, 3 и 1 kDa (*на енгл.* molecular weight cut-off) користиле су се према редоследу смањења величине пора, како би се изловање фракција извршило што ефикасније. Процес сепарације протеинских хидролизата изведен је коришћењем ультрафилтрационе јединице (Model 8050 1 Unit, Millipore Corporation, Bedford, Масачусетс, САД) са целулозним мембранама под притиском азота од 40 psi. Током ултрафилтрације, магнетна мешалица се користила за континуално мешање хидролизата и/или фракција пермеата унутар чаше при фиксираној брзини обртаја 150 o/min. Шематски приказ процес ултрафилтрације хидролизата и ультрафилтрациона јединица приказани су на Слици 6.11.

У циљу раздвајања хидролизата протеина беланцета, смеше ди-, три- и олигопептида, на биолошки активне фракције пептида мањих молекулских маса, прво је фракционисано 50 cm<sup>3</sup> хидролизата кроз мембрану од 30 kDa на ретентат-1 (**фракција-1**, смеша пептида >30 kDa) и пермеат-1 (смеша пептида молекулске масе <30 kDa). Фракција пермеат-1 даље је ултрафилтрирана кроз мембрану величине пора 10 kDa издвајајући том приликом ретентат-2 (**фракција-2**, смеша пептида 10-30 kDa) и пермеат-2 (смеша пептида молекулске масе <10 kDa). Потом је узорак другог пермеата пропуштен кроз мембрану величине пора 3 kDa како би се извојиле фракције пептида ретентат-3 (**фракција-3**, смеша пептида 3-10 kDa) и пермеат-3

(смеша пептида молекулске масе  $<3$  kDa). На крају, трећи пермеат подвргнут је ултрафилтрацији кроз мембрану величине пора 1 kDa и изоловане су фракције пептида ретентат-4 (**фракција-4**, смеша пептида 1-3 kDa) и пермеат-4 (**фракција-5**, смеша пептида молекулске масе  $<1$  kDa). Након завршене фазе фракционисања и сакупљања изолованих фракција ретентата и пермеата, свака мембрана је, одмах по коришћењу, испрана по процедури за испирање назначеној на амбалажи произвођача мембрана. Процедура је прво подразумевала испирање 0,1 М раствором натријум-хидроксида 30 минута, а затим темељно испирање дејонизованом водом, при чему се практиковало да се проспусти два пута по  $50\text{ cm}^3$  воде. Правилно испране мембране чуване су у фриџидеру на  $4\text{ }^\circ\text{C}$  у 10% раствору етанола.



**Слика 6.11.** а) шематски приказ експерименталне ултрафилтрационе јединице; б) ултрафилтрациона чаша; в) технолошка шема ултрафилтрационог раздвајања хидролизата протеина беланцета на биолошки активне фракције пептида.

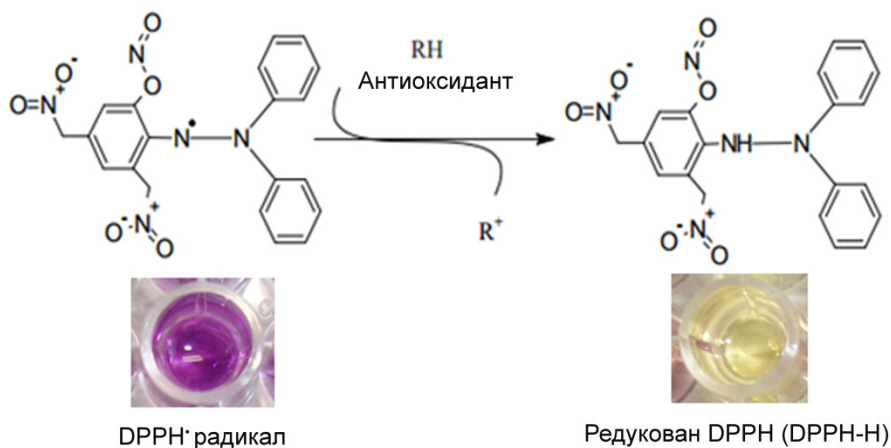
Свака фракција пермеата и ретентата сакупљана је и одмах коришћена за одређивање масеног удела протеина. По завршетку анализа, узорци су чувани у фризу на  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , у течном или лиофилизованом облику. Масени удео ултрафилтрационих мембранских фракција пептида израчунат је као однос масе

пептида сваке изоловане фракције и масе пептида почетног хидролизата пре ултрафилтрације, а квантитативни садржај пептида одређен је методом по Лорију, описаној у одељку 5.3.8. Претходно описан протокол фракционисања кроз ултрафилтрационе мембране изведен је у трипиклату и масени удео је приказан као средња вредност свих квантитативних мерења.

### 6.3.13. *In vitro* методе за мерење антиоксидативне активности хидролизата и/или пептидних фракција

#### 6.3.13.1. Одређивање антиоксидативне активности методом редукције DPPH<sup>•</sup> радикала

Способност неутрализације DPPH<sup>•</sup> радикала испитана је уобичајном методом са мањим изменама приликом извођења поступка анализе.<sup>202-203</sup> Метода неутрализације DPPH<sup>•</sup> радикала широко је распрострањена при одређивању антиоксидативне активности на дугоживећим радикалима и представља стандардну методу утврђивања опште антиоксидативне активности супстанци. DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) је стабилан азотни радикал, интензивно љубичасте боје који се приликом реакције са дономом протона редукује до DPPH-H чије је боја жута (Слика 6.12). Интензитет промене боје током реакције пратио се спектрофотометријским мерењем апсорбанце на таласној дужини 517 nm користећи UV-Vis спектрофотометар.



Слика 6.12. Механизам реакције DPPH<sup>•</sup> радикала са антиоксидантом.

За одређивање способности неутрализације DPPH радикала хидролизата протеина беланцета прво је припремљен 0,15 mM раствор DPPH у метанолу. Хидролизати протеина беланцета сведени су на исте концентрације протеина 1,2

mg/cm<sup>3</sup>, а аликвот узорака од 0,5 cm<sup>3</sup> помешан је са 0,5 cm<sup>3</sup> раствора DPPH. У истом односу припремљени су и серије узорака хидролизата протеина беланцета са метанолом, твз. бленк узорци (*на енгл.* blank), како би редуково утицај таложења протеина, али и узорак контроле код кога је запремина протеина замењена метанолом. Смеше у епруветама су снажно вортексиране и остављене да се инкубирају на собној температури 30 минута у мраку. Резултати су изражени као проценат инхибиције, односно степена неутралисања DPPH радикала у односу на контролни узорак, према следећој једначини:

$$DPPH (\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{узорак}} - A_{\text{бленк}}}{A_{\text{контрола}}}\right) \cdot 100 \quad (6.8)$$

где је,  $A_{\text{узорак}}$  измерена апсорбанца узорка хидролизата протеина беланцета са раствором DPPH,  $A_{\text{бленк}}$  измерена апсорбанца узорка хидролизата протеина беланцета са метанолом и  $A_{\text{контрола}}$  измерена апсорбанца контролног узорка без протеина који је садржао само метанол и раствор DPPH.

#### 6.3.13.2. Одређивање редукујуће моћи

Редукујућа моћ хидролизата протеина беланцета одређена је по литературној методи са одређеним изменама.<sup>204</sup> Узорци хидролизата протеина беланцета непосредно пре анализе сведени су на исте концентрације протеина (1,2 mg/cm<sup>3</sup>), а 0,5 cm<sup>3</sup> аликвота мешано је са 2,5 cm<sup>3</sup> 0,2 М натријум фосфатног пуфера (pH 6,6). Овој смеси додаје се 2,5 cm<sup>3</sup> 1% раствора калијум-хексацијаноферата(III), снажно вортексира и инкубира се 20 минута на 50 °C. По завршетку инкубације реакционе смеше су охлађене на собној температури и додато им је 2,5 cm<sup>3</sup> 10% раствора трихлорсирћетне киселине. Узорци су затим центрифугирани 10 минута на 3000 o/min, супернатант је декантован и разблажен са 2,5 cm<sup>3</sup> дејонизоване воде. Овако спремљеним узорцима дадато је 2,5 cm<sup>3</sup> 0,1% раствора гвожђе(III)-хлорида и мерена је промена апсорбанце на 700 nm у односу на слепу пробу, која садржи све наведене реагенсе, али се уместо узорка протеина користи пуфер. Повећање апсорбанце узорака протеина беланцета указивало је на већу редукујућу моћ.

#### 6.3.13.3. Одређивање антиоксидативне активности методом редукције ABTS радикала

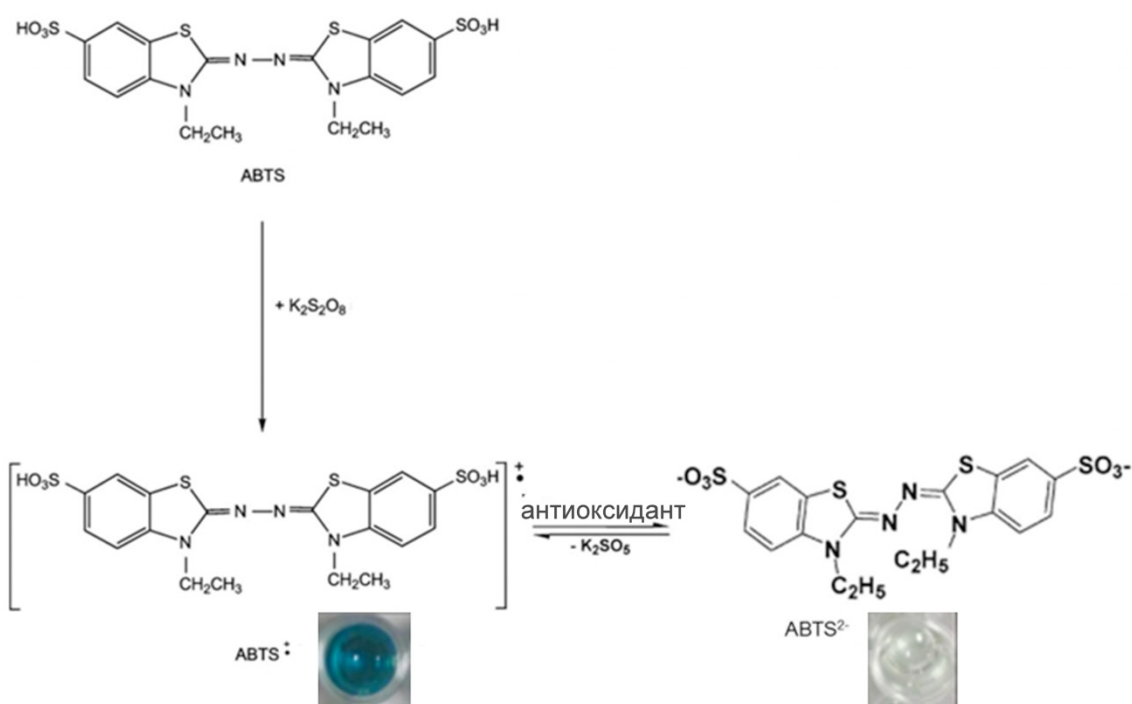
Способност хидролизата протеина беланцета и њихових ултрафилтрационих фракција пептида да редукују ABTS<sup>•+</sup> радикал испитана је у складу са описаном ABTS методом.<sup>205</sup> Оксидација 2,2'-азино-бис(3-етилбезотиазолин-6-сулфонска киселина)-

диамонијумове соли (ABTS) до зеленог ABTS<sup>•+</sup> радикала и његова редукција у присуству донора електрона, антиоксидативних молекула, која се манифестује обезбојавањем основне су реакције на којима се заснива ABTS метода (Слика 6.13). Радикал катјон ABTS<sup>•+</sup> производ је реакције између 7mM раствора ABTS и 140 mM раствора калијум-пресулфата, при чему се раствори реагенаса мешају до крајње молеарне концентрације смеше 2,5 mM. Реакциона смеша се стабилизује чувањем у мраку на собној температури најмање 16 часова. Непосредно пре употребе раствор радикал катјона ABTS<sup>•+</sup> разблажен је 5 mM фосфат-пуферованим физиолошким раствором (*на енгл.* phosphate buffered saline-PBS; pH 7,4) до апсорбанце 0,700±0,05. Овако разблажени ABTS<sup>•+</sup> (1 cm<sup>3</sup>) меша се са 0,01 cm<sup>3</sup> хидролизата и/или фракција пептида сведених на исту концентрацију протеина (1,2 mg/cm<sup>3</sup>), а интензитет обезбојавања стабилног бисрадикал катјона мерен је након 5 минута спектрофотометријски на таласној дужини 734 nm. Резултати су изражени као проценат инхибиције, односно степена неутралисања ABTS<sup>•+</sup> у односу на контролни узорак према једначини:

$$ABTS (\%) = \frac{A_{\text{контрола}} - A_{\text{узорак}}}{A_{\text{контрола}}} \cdot 100 \quad (6.9)$$

где је,  $A_{\text{узорак}}$  измерена апсорбанца узорка хидролизата и/или фракције пептида протеина беланцета са разблаженим раствором ABTS<sup>•+</sup> и  $A_{\text{контрола}}$  измерена апсорбанца контролног узорка који уместо протеина садржи PBS пуфер.

Такође, за анализиране хидролизате и фракције пептида протеина беланцета одређене су минималне инхибиторне концентрације, тј. IC<sub>50</sub> вредности за сваки узорак пептида које представљају ону концентрацију пептида потребну за половину максималне инхибиторне активности, и уједно ове вредности концентрација мера су ефективности пептида у инхибирању ове специфичне антиоксидативне активности. Наведена серија експеримената изведена је припремањем најмање четири разблажења узорка хидролизата и/или фракција пептида протеина беланцета и одређивањем инхибиторне активности за те концентрације. Осим тога, тест је стандардизован коришћењем Тролокса, синтетичког антиоксиданта у опсегу концентрација 5-200 µg/cm<sup>3</sup> раствореног у PBS пуферу, па су резултати изражени као µmol Тролокс еквивалената по mg протеина еквивалент (Тролокс еквивалент антиоксидативне активности, *на енгл.* Trolox equivalent antioxidant activity – TEAA).



**Слика 6.13.** Механизам оксидације АВТS у присуству калијум-персулфата и реакција АВТS<sup>•+</sup> радикал катјона у облику хромофоре са антиоксидантом.

#### 6.3.13.4. Одређивање способности неутрализације хидроксила радикала

Способност хидролизата протеина беланцета и изолованих фракција пептида да неутралишу реактивне кисеоничне врсте, хидроксила радикале који настају Фентоновом реакцијом, одређена је примењујући  $\alpha$ -дезоксирибоза оксидациону методу са незнатним изменама, на следећи начин.<sup>97, 206</sup> Непосредно пре анализе припремљени су узорци пептида свођењем на једнаке концентрације у вредности 1,2 mg/cm<sup>3</sup> коришћењем дејонизоване воде. 0,25 cm<sup>3</sup> аликуота припремљених узорака пептида пренесено је аутоматском микропипетом у епрувете и помешано са 0,20 cm<sup>3</sup> раствора FeSO<sub>4</sub>-EDTA (10 mM раствор припремљен растварањем FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O и EDTA, истих концентрација, у 0,1 M фосфатном пуферу рН 7,4) и 0,25 cm<sup>3</sup> раствора  $\alpha$ -дезоксирибозе (10 mM раствор припремљен у 0,1 M фосфатном пуферу рН 7,4). Реакциона смеша допуњена је фосфатним пуфером до запремине 0,90 cm<sup>3</sup>. Фентонова реакција у којој се генерише хидроксила радикал, •ОН, иницирана је додавањем 0,10 cm<sup>3</sup> 100 mM раствора водоник-пероксида. Целокупан садржај у епруветама веортексиран је и инкубиран у воденом купаталу сат времена на 37 °C, уз повремено мешање. Реакција је прекинута додавањем 0,50 cm<sup>3</sup> 2,8% раствора трихлорсирћетне киселине (ТСА) и 0,50 cm<sup>3</sup> 1% раствора тиобарбитурне киселине

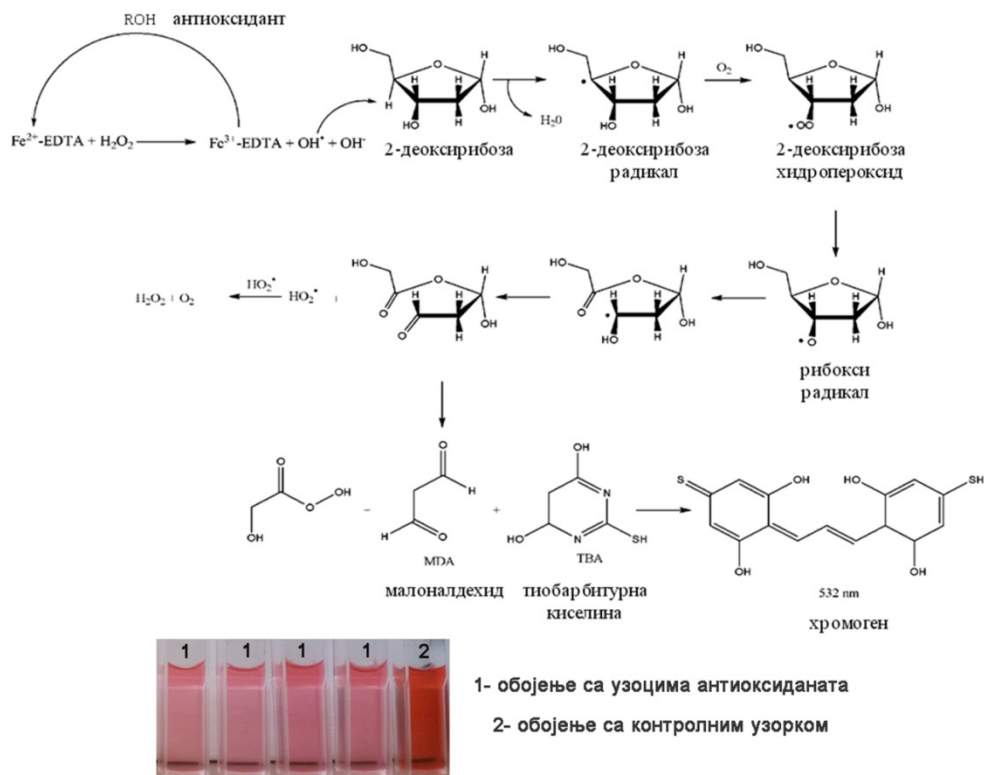
(ТВА). Реакциона смеша је поново инкубира 15 минута у воденом купатилу на 90°C. Степен оксидације  $\alpha$ -деоксирибозе након инкубирања одређен је спектрофотометрисјким мерењем апсорбанце узорака пептида и контроле на таласној дужини 532 nm (у односу на фосфатни пуфер), а проценат инхибиције, односно степен неутралисања  $\cdot\text{OH}$  радикала (*на енгл. hydroxyl radical scavenging activity-HRSA*) израчунат је према једначини:

$$HRSA (\%) = \frac{A_{\text{контрола}} - A_{\text{узорак}}}{A_{\text{контрола}}} \cdot 100 \quad (6.10)$$

где је,  $A_{\text{узорак}}$  измерена апсорбанца узорка хидролизата и/или фракције пептида протеина беланцета у реакцији инхибиције оксидације  $\alpha$ -деоксирибозе и  $A_{\text{контрола}}$  измерена апсорбанца контролног узорка који уместо протеина садржи фосфатни пуфер. На слици 6.14 приказан је механизам деградације  $\alpha$ -деоксирибозе у присуству хидроксил радикала након његовог генерисања у Фентоновој реакцији и механизам инхибиције антиоксидантом. У случају високог степена оксидације  $\alpha$ -деоксирибозе генерише се велика количина меландиалдехида који у реакцији са ТВА образује хромоген интензивно пурпурне боје.

Резултати неутрализације хидроксил радикала за анализиране хидролизате и фракције пептида протеина беланцета представљени су и одређивањем минималне инхибиторне концентрације, тј.  $\text{IC}_{50}$  вредности за сваки узорак пептида које представљају ону концентрацију пептида потребну за половину максималне инхибиторне активности. Наведена серија експеримената изведена је припремањем најмање четири разблажења ( $0,012$ - $0,6 \text{ mg/cm}^3$ ) узорака хидролизата и/или фракција пептида протеина беланцета и одређивањем инхибиторне активности. Додатно, анализа је стандардизована коришћењем Тролокса, синтетичког антиоксиданта у опсегу концентрација  $5$ - $200 \text{ }\mu\text{g/cm}^3$  раствореног у дејонизованој води, па су резултати су изражени као  $\mu\text{mol}$  Тролокс еквивалената по  $\text{mg}$  протеина еквивалент (Тролокс еквивалент антиоксидативне активности, *на енгл. Trolox equivalent antioxidant activity – TEAA*).





**Слика 6.14.** Шематски приказ деградација, тј. оксидације  $\alpha$ -деоксирибозе након у присуству хидроксилног радикала и механизам инхибиције антиоксидантом.

### 6.3.13.5. Одређивање способности неутрализације супероксид радикала

Одређивање способности неутрализације супероксид радикала, односно инхибиције  $\text{O}_2^{\cdot-}$  анјона, хидролизата протеина беланцета и изолованих фракција пептида спроведено је коришћењем спектрофотометриског мерења инхибиције аутооксидације пирогалола, као што је описано од стране Алаши (Alashi) и сарадника<sup>207</sup> са мањим модификацијама. Узорци хидролизата и фракција пептида разблажени су 50 mM Tris-HCl пуфером рН 8,3 који садржи 1 mM EDTA до крајње концентрације 1 mg/cm<sup>3</sup>. Аликвот од 0,16 cm<sup>3</sup> сваког припремљеног разблаженог узорка пренесен је мултиканалном аутоматском пипетом у бунарчиће микротитарске плоче. Пуфер коришћен за припрему разблажења додат је у бунарчиће означене за контролу (0,16 cm<sup>3</sup>), док је дејонизована вода пренесена у бунарчић означен као бленк (0,24 cm<sup>3</sup>). Припремљен раствор 1,5 mM пирогалола у 10 mM HCl (0,08 cm<sup>3</sup>) додат је у сваки бунарчић са узорком пептида и у контролну са пуфером, па је микротитарска плоча инкубирана на собној температури у мраку (плоча обавијена фолијом) током временског периода од 4 минута. Ток реакције праћен је мерењем апсорбанце на 320 nm одмах по додавању пирогалола и након завршетка

инкубационог периода коришћењем читача микротитарских плоча (Multiscan GO, Thermo Fisher Scientific, Волтам, Масачусетс, САД). Процент инхибиције супероксида анјона (*на енгл.* superoxide radical scavenging assay-SRSA) израчунат је према следећој формули:

$$SRSA (\%) = \frac{\Delta A_{\text{контрола}} - \Delta A_{\text{узорак}}}{\Delta A_{\text{контрола}}} \times 100 \quad (6.11)$$

где је,  $\Delta A_{\text{узорак}}$  разлика измерених апсорбанци узорка хидролизата и/или фракције пептида протеина беланцета у реакцији инхибиције аутооксидације пирогалолола у времену  $t = 0$  минута и  $t = 4$  минута, а  $\Delta A_{\text{контрола}}$  разлика измерених апсорбанци контролног узорка. Тролокс је коришћен као позитивна контрола како би се резултати приказали и као  $\mu\text{mol}$  Тролокс еквивалент по  $\text{mg}$  протеина (стандарна права је припремљена припремањем серије различитих разблажења Тролока у опсегу концентраја  $5\text{-}200 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ). Такође, одређене су и вредности  $IC_{50}$  за све узорке пептида са највећом активношћу припремањем серија разблажења од минимум  $4 (0,012\text{-}0,6 \text{ mg}/\text{cm}^3)$ , тако да је у овом случају  $IC_{50}$  дефинисана као она концентрација пептида потребна да се инхибира  $50\%$  укупних радикала супероксида анјона.

#### 6.3.13.6. Одређивање способности хелирања металних јона

Антиоксидативна активност хидролизата протеина беланцета и изолованих фракција испитана је и са аспекта њихове способности да хелирају металне јоне, конкретно јоне  $Fe^{2+}$ , по методи Декера (Decer) и Велчове (Welch) са незнатним изменама.<sup>208</sup> Наиме, ферозин (натријумова со 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-4',4''-дисулфонске киселине) образује комплекс са јонима  $Fe^{2+}$  интензивно љубичасте боје са максималним пиком апсорпције на  $562 \text{ nm}$ . У присуству антиоксиданата хелационом активношћу долази до инхибиције стварања комплекса  $Fe^{2+}$ -ферозин, односно преноса електрона, а обезбојавање се може запазити и визуелно (Слика 6.15).

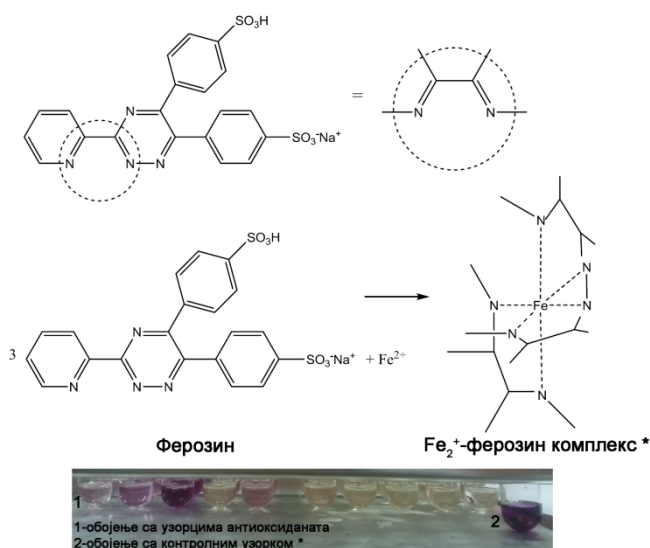
Узорци хидролизата и фракција пептида разблажени су дејонизованом водом до крајње концентрације  $1 \text{ mg}/\text{cm}^3$ , па је  $0,2 \text{ cm}^3$  аликвота испитиваног узорка пептида пренесен у епрувете у које је претходно сипано  $0,8 \text{ cm}^3$  дејонизоване воде. Сваком узорку додато је  $0,1 \text{ cm}^3$   $2 \text{ mM}$  раствора  $FeCl_2$  раствореног у дејонизованој води. Реакциона смеша је пажљиво вортексирна и инкубирана 3 минута на собној температури. По истеку инкубационог времена додато је  $0,2 \text{ cm}^3$   $5 \text{ mM}$  раствора ферозина припремљеног у дејонизованој води. Смеше су поново вортексирне

постављене да се инкубирају 10 минута на собној температури, а по завршетку реакције степен хелатне активности одређен је спектрофотометријским мерењем промене апсорбанце на таласној дужини 562 nm у односу на дејонизовану воду. Способност испитиваних узорка пептида да у наведеним експерименталним условима хелирају металне јоне изражена је у односу на контролни узорак, узорак без пептида, као степен хелатне активности (*на енгл. metal-ion chelating activity-MICA*) према следећој једначини:

$$MICA (\%) = \frac{A_{\text{контрола}} - A_{\text{узорак}}}{A_{\text{контрола}}} \cdot 100 \quad (6.12)$$

где је,  $A_{\text{узорак}}$  измерена апсорбанца узорка хидролизата и/или фракције пептида протеина беланцета у реакцији инхибиције формирања  $\text{Fe}^{2+}$ -ферозин комплекса и  $A_{\text{контрола}}$  измерена апсорбанца контролног узорка који уместо протеина садржи дејонизовану воду.

Етилендиаминтетрасирћетна киселина (EDTA) коришћена је у овој анализи као позитивна контрола како би се резултати приказали и као  $\mu\text{mol}$  EDTA еквивалент по  $\text{mg}$  протеина (стандарна права је припремљена припремањем серије различитих разблажења EDTA са дејонизованом водом у опсегу концентраја 0-30  $\mu\text{M}$ ). Такође, одређене су и вредности  $\text{IC}_{50}$  за све узорке пептида са највећом активношћу припремањем серија разблажења од минимум 4 (0,010-0,50  $\text{mg}/\text{cm}^3$ ), тако да је у овом случају  $\text{IC}_{50}$  дефинисана као она концентрација пептида која одговара хелатној активности од 50%, а потпуно идентично као и у претходним методама добијена је коришћењем једначине након линеарне регресије.



Слика 6.15. Механизам формирања  $\text{Fe}^{2+}$ -ферозин комплекса-интензиво љубичасто обојење.

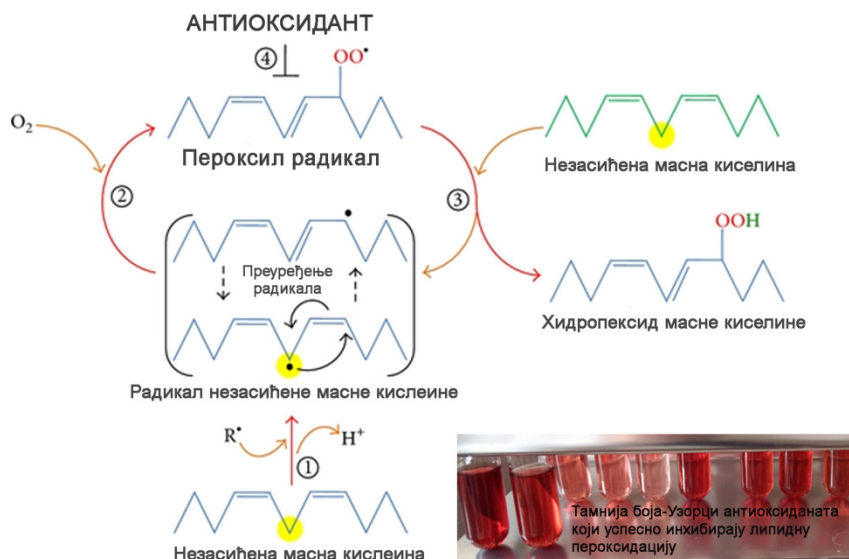
### 6.3.13.7. Одређивање способности инхибиције липидне пероксидације

Инхибиција липидне пероксидације, иницирана додавањем линоле киселине, одређена је амонијум-тиоцијанатном методом у модел систему емулзије хидролизата и/или фракција пептида протеина беланцета са линолном киселином, према модификованој литературној методи за протеине беланцета.<sup>209</sup> Најпре су узорци хидролизата протеина беланцета и изолованих пептидних фракција разблажени и сведени на исте концентрације протеина од 1,3 mg/cm<sup>3</sup> употребом 50 mM фосфатног пуфера рН 7. Потом, у засебним одговарајућим лабораторијским судовима обложеним алуминијумском фолијом, емулзија линолне киселине припремљена је мешањем испитиваних узорка пептида (1,54 cm<sup>3</sup> аликвота узорка пептида и 8,46 cm<sup>3</sup> фосфатног пуфера; концентрација пептида ~200 ppm), 10 cm<sup>3</sup> раствора апсолутног (99,5%) етанола и 0,13 cm<sup>3</sup> линолне киселине. Укупна запремина (25 cm<sup>3</sup>) у сваком суду подешена је додавањем дејонизоване воде и извршена је хомогенизација смеше интензивним мешањем. Одмах затим, реакционе смеше инкубирани су 7 дана у мраку на 50±1 °С, како би се процес оксидације линолне киселине убрзао. Узорци у којима су испитивани пептиди замењени аскорбинском киселином (концентрације 200 ppm; 10 cm<sup>3</sup>) и фосфатним пуфером (10 cm<sup>3</sup>), припремљени су упоредо, ради поређења, а представљали су позитивну и негативну контролу, редом.

Током инкубације, у различитим временским интервалима (сваких 24 сата) узорковани су аликвоти реакционих смеша запремене 0,1 cm<sup>3</sup>, а степен липидне пероксидације одређен је у складу са гвожђе-тиоцијанатном методом.<sup>210</sup> У ту сврху аликвот реакционе смеше помешан је са 4,7 cm<sup>3</sup> 75% раствора етанола, 0,1 cm<sup>3</sup> 30% раствора амонијум-тиоцијаната (расворен у дејонизованој води) и 0,1 cm<sup>3</sup> 20 mM раствора гвожђе (II)-хлорида раствореног у 3,5% раствору хлороводичне киселине. Припремљена смеша реагенса вортексирана је и након инкубације од 3 минута на собној температури измерена је промена апсорбанце на 500 nm. Процент инхибиције липидне пероксидације (*на енгл.* inhibition of lipid peroxidation-ILP) израчунава се у односу на контролни узорак, за сваки временски интервал, према једначини (6.13):

$$ILP(\%) = \frac{A_{\text{контрола}} - A_{\text{узорак}}}{A_{\text{контрола}}} \cdot 100 \quad (6.13)$$

где је,  $A_{\text{узорак}}$  измерена апсорбанца узорка хидролизата и/или фракције пептида протеина беланцета и позитивне контроле у реакцији инхибиције липидне пероксидације и  $A_{\text{контрола}}$  измерена апсорбанца узорка негативне контроле.



Слика 6.16. Шематски приказ процеса липидне пероксидације и механизма инхибиције антиоксидантом.

На Слици 6.16, дат је шематски приказ процеса липидне пероксидације и механизма инхибиције антиоксидантом. У фази иницијације, прооксиданти издвајају алилни водоник формирајући липидни радикал са угљеником у центру са тенденцијом стабилизације молекуларним преуређивањем да би се формирао коњуговани диен (фаза 1). У фази пропације липидни радикал брзо реагује са кисеоником како би се формирао липидни перокси радикал (фаза 2) који везује водоник из другог молекула незасићене киселине стварајући нови радикал незасићене масне киселине и хидропероксид масне киселине (фаза 3). У реакцији терминације, антиоксиданти донирају атом водоника пероксил радикалу, што резултира стварањем нерадикалних производа (фаза 4).<sup>211</sup>

#### 6.3.13.8. Одређивање способности инхибиције оксидативне деградације $\beta$ -каротена

Антиоксидативна активност хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом ( $20 \pm 0,2$  kHz) и изолованих пептидних фракција у липидном модел систему одређена је на основу оксидативне деградације  $\beta$ -каротона у емулзији  $\beta$ -каротен-линолна киселина.<sup>212</sup> Узорци пептида разблажени су дејонизованом водом до концентрације  $1 \text{ mg/cm}^3$  и као такви коришћени у даљој анализи. Најпре је  $2 \text{ mg}$  кристалног  $\beta$ -каротена расворено у  $10 \text{ cm}^3$  хлороформа, након чега је  $2 \text{ cm}^3$  аликуота

аутоматском пипетом пренесено у балон са округлим дном и шлифом и помешано са реагенсима у њему. Претходно, у балон је сипано 20 mg линолне киселине и 200 mg средства за стабилизовање емулзије, емулгатора Tween-40. Након упаравања хлороформа на вакуум упаривачу (температура 40 °C, 474 mbar), додато је 50 cm<sup>3</sup> дестиловане и деаерисане воде је додато, а ради потпуне хомогенизације извршено је енергично мешање. Аликвот формиране водене емулзије запремине 5 cm<sup>3</sup> пипетиран је у сваку епрувету у којој се налазило 0,2 cm<sup>3</sup> испитиваних узорака пептида протеина беланцета. Контролни узорак (негативна контрола) је такође припремљен и у овом случају садржао је 0,2 cm<sup>3</sup> дејонизоване воде уместо испитиваних узорака пептида. Синтетски антиоксидант Тролокс у концентрацији 100 ppm анализиран је, ради поређења резултата, као позитивна контрола. Одмах по мешању емулзије и узорака пептида потенцијалних антиоксиданата (нулти тренутак,  $t=0$ ) очитана је апсорбанца на 420 nm. Потом, серије узорака у киветама обложене су фолијом и инкубиране у воденом купатили на 50 °C, а у правилним временским интервалима (сваких 15 минута) промена апсорбанце је очитавана све до тренутка када је уочено потпуно обезбојавање  $\beta$ -каротена (око 2-3 сата). Слепа проба, на основу које су очитаване промене апсорбанци, садржала је 20 mg линолне киселине и 200 mg Tween-40 помешаних у балону са округлим дном и допуњена је дестилованом и деаерисаном водом (52 cm<sup>3</sup>).

Брзина деградације  $\beta$ -каротена израчуната је на основу кинетике првог реда према следећој формули:<sup>213</sup>

$$v = \ln\left(\frac{a}{b}\right) \cdot \frac{1}{t} \quad (6.14)$$

где је,  $v$  брзина деградације  $\beta$ -каротена,  $a$  је очитана апсорбанца узорка пептида, синтетског антиоксиданта или негативне контролен у  $t=0$  минута,  $b$  је очитана апсорбанца узорка пептида, синтетског антиоксиданта или негативне контролен у  $t=120$  минута. На основу тога, антиоксидативна активност пептида протеина беланцета изражена као степен обезбојавања тј. деградације  $\beta$ -каротена (на енгл.  $\beta$ -carotene bleaching-BCB) у липидном модел систему израчуната је преко следеће једначине:

$$BCB(\%) = \frac{v_k - v_u}{v_k} \cdot 100 \quad (6.15)$$

где је  $v_k$  брзина деградације  $\beta$ -каротена у присуству негативне контроле, а  $v_u$  брзина деградације  $\beta$ -каротена у присуству антиоксидативних пептида и/или Тролокса.

#### 6.3.14. Мерење антипролиферативне активности хидролизата и/или пептидних фракција *in vitro* методом

Антипролиферативна активност одабраних хидролизата и/или фракција пептида протеина беланцета испитана је на две туморске ћелијске линије: MCF-7 (хумана ћелијска култура аденокарцинома дојке) и SW480 (хумана ћелијска линија колоректалног аденокарцинома), набављене из колекције АТСС (*на енгл.* American Type Culture Collection, Роквил, САД). Испитивање инхибиторног дејства на пролиферацију туморских ћелија MCF-7 и SW480 хидролизата и/или фракција пептида извршено је колориметријским МТТ тестом, који се заснива на способности редукције жуте тетразолијумове соли (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид – МТТ; Sigma Aldrich, St. Louis, Мисури, САД) митохондријалном сукцинат дехидрогеназом, ензимом вијабилних ћелија, при чему настаје плави нерастворни формазан. Како је ова реакција катализована само ензимима метаболички активних ћелија, конверзија МТТ-а у формазан доводи се у директну везу са бројем вијабилних ћелија у култури, односно степеном пролиферације. Додатно, испитивање цитотоксичног ефекта хидролизата и/или фракција пептида обухватило је тестирање утицаја хидролизата и/или фракција пептида на пролиферацију мезенхималних матичних ћелија изолованих из перидонталног лигамента (PDLSCs) на начин описан у претходно публикованој студији Окић Ђорђевић и коаутора,<sup>214</sup> као типа примарних хуманих ћелија.

Најпре су ћелијске културе култивисане на 37 °C у инкубатору, у атмосфери засићеној воденом паром, са 5% CO<sub>2</sub> у стандардном медијуму за раст ћелијских култура који чини DMEM (*на енгл.* Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma St. Louis, Мисури, САД) обogaћен са 10% феталног говеђег серума, FBS (*на енгл.* Fetal Bovine Serum, Capricorn Scientific GmbH, Република Немачка) и 100 U/cm<sup>3</sup> пеницилин/стрептомицина (Capricorn Scientific GmbH, Република Немачка). За тестирање, ћелије су засејане у концентрацији од 1×10<sup>4</sup> ћелија/отвору високо-адхерентне лако-испирајуће плоче са 96 места и култивисане у стандардном медијуму 24 сата. Узорци хидролизата и/или фракција пептида протеина беланцета за то време су стерилисани филтрацијом кроз 0,45 μm филтер и припремљени су раствори различите концентрације (прављена су разблажења са стандардним медијумом за култивацију ћелија у интервалу од 1:5 до 1:100 пута). Наредног дана,

ћелије су третиране са по  $0,10 \text{ cm}^3$  растућих концентрација хидролизата и/или фракција пептида, али и стандардног медијума (позитивна контрола) и нетретираним нативним беланцетом (негативна контрола). Концентрације приказане у резултатима представљају ефективне концентрације у финалном раствору теста. Након 24, 48 и 72 сата инкубације, у медијум са ћелијама додавано је  $0,02 \text{ cm}^3$  МТГ-а концентрације  $0,5 \text{ mg/cm}^3$  раствореног у PBS пуферу. Два сата по инкубацији на  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , медијум је одстрањен, а формиран кристали формаза растварани су додавањем диметил сулфооксида ( $0,15 \text{ cm}^3$ ). Оптичка густина мерена је на аутоматском читачу микротитарских плоча на таласној дужини  $540 \text{ nm}$  (Labcsystems Multiskan Plus, Финска).

Тест пролиферације ћелијских линија изведен је најмање три пута за сваку ћелијску линију аденокарцинома, као и за мезенхималне матичне ћелије. Релативна вијабилност ћелија израчуната је коришћењем количине МТГ-а преведеног у кристални формазан, а резултати су приказани као проценат живих метаболички активних ћелија, тј. пролиферације у поређењу са стандардним медијумом, позитивном контролом култивисаној у одсуству хидролизата и фракција пептида.

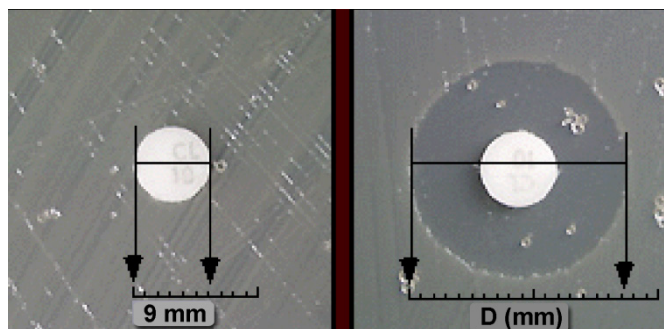
#### **6.3.15. Мерење антимикробне активности хидролизата и/или пептидних фракција**

Антимикробна активност хидролизата и/или фракција пептида испитана је стандардним микробиолошким *in vitro* методама – методом дифузије на агарној подлози и бујон дилуционом методом одређивања минималне инхибиторне концентрације (*на енгл.* minimal inhibitor concentration-МИС). Микробиолошки тестови спроведени су на Грам-позитивним (*S. aureus* АТСС 25923), Грам-негативним (*E. coli* АТСС 25922) стандардизованим културама бактерија и квасаца (*C. albicans* АТСС 24433) који чине део колекције микроорганизама лабораторије за микробиологију ТМФ-а, Универзита у Београду.

Осетљивост микроорганизама заснована на принципу дифузије испитиваних узорака хидролизата и/или фракција пептида кроз агарну подлогу испитана је у складу са методом описаној у студији Аничкић и сарадника.<sup>215</sup> Укратко, за припрему агарне подлоге, твз. основног медијума коришћен је триптон соја бујон (TSB, Торлак, Република Србија) обогаћен екстрактом квасца ( $0,6\% \text{ w/v}$ ). Основна подлога коришћена је за припрему храњиве агарне подлоге растварањем агара концентрације



1,8% *w/v* (триптон соја агар, TSA, Торлак, Република Србија). На слоју разливене хранљиве агарне подлоге TSA у петри шољама, након инкубације у термостату 24 сата на 30 °C, на обележене тачке постављени су цилиндри пречника 9 mm. Преко агарне подлоге TSA са постављеним бинарчићима преливена је мекана, тзв. *soft* или ТОП агарна подлога (основни медијум обogaћен додатком 0,6% агара) која је инокулисана одговарајућим индикаторским микроорганизмом. Детаљније, 6 cm<sup>3</sup> топ агарне подлоге било је засејано са 0,20 cm<sup>3</sup> 24-часовне културе приближне концентрације 2×10<sup>5</sup> CFU/cm<sup>3</sup>. Након очвршћавања меког агара од 20 минута, цилиндри су стерилно уклоњени, чиме су формиран бунарчићи пречника 9 mm. У тако формиране бунарчиће микропипетом нането је 0,030 cm<sup>3</sup> сваког од испитиваних узорака нативних протеина беланцета, хидролизата и/или фракција пептида сведених на исту концентрацију 1 mg/cm<sup>3</sup>. Као позитивна контрола коришћена је иста запремина стандардног комерцијалног антибиотика широког спектра деловања, неомицина, концентрације 0,35 mg/cm<sup>3</sup>. Петри шоље инкубиране су 48 сати у термостату на температури од 37 °C. Након завршене инкубације измерене су ширине зона инхибиције и/или зона смањеног раста (дифузије) које су се образовале, при чему је пречник, *D* измерен у милиметрима и дефинисан као на Слици 6.17.



Слика 6.17. Пречник формираног бунарчића (*лево*) и пречник зоне инхибиције и/или смањеног раста (*D*) (*десно*).

**Минимална инхибиторна концентрација (МИС)** испитиваних узорака хидролизата и/или фракција пептида, према којима су анализирани бактеријски сојеви испољили највећу осветљивост, одређена је коришћењем микродилуционе методе на микротитарским плочама са 96 места. Ова метода подразумевала је мешање 0,050 cm<sup>3</sup> свеке суспензије бактеријских инокулума (концентрација ћелија је подешена на 1×10<sup>5</sup> CFU/cm<sup>3</sup>) са 0,050 cm<sup>3</sup> припремљених серија разблажења

анализираних узорака хидролизата и/или фракција пептида у бунарчиће микротитарских плоча, које су инкубирани у термостату на 37 °C. Раст стандардизованих култура бактерија *S. aureus* (ATCC 25923) и *E. coli* (ATCC 25922) процењен је након 24 сата читавањем оптичке густине, тј. апсорбанце на таласој дужини од 600 nm, коришћењем читача микротитарских плоча (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, САД). Најмања концентрација хидролизата и/или фракција пептида при којој није забележена видљива промена раста, односно при којој није прочитана промена почетне апсорбанце, утврђена је као минимална инхибиторна концентрација. Ради верификовања добијених резултата, 0,030 cm<sup>3</sup> анализираних узорака минималне инхибиторне концентрације реинокулисано је на чврстој агарној подлози TSA и инкубирано следећих 48 сата на 37 °C, након чега је установљено да ли постоји уочљив раст колонија. Како би се осигурала репродуктивност резултата сви експерименти у циљу одређивања пречника зоне инхибиције и минималне инхибиторне концентрације изведени су у трипликату.

#### **6.3.16. Мерење антихипертензивне активности хидролизата и/или пептидних фракција**

Антихипертензивна активност хидролизата и/или изолованих фракција пептида протеина беланцета одређена је *in vitro* спектрофотометријском методом користећи две врло сличне методе описане у студијама Чанг и коаутора<sup>216</sup> и Кју и коаутора<sup>217</sup>, са мањим изменама, а на основу мерења ACE-инхибиторне активности употребом читача микротитарских плоча (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific). Као супстрат коришћен је пептид хипурил-хистидин-леуцин (ННЛ) и ангиотензин-конвертујући ензим (ACE) изолован из плућног ткива зеца (ЕС 3.4.15.1) декларисане активности 0,25 U.<sup>с</sup> Непосредно пре анализирања узорци хидролизата и/или фракција пептида сведени су на исту концентрацију пептида 1 mg/cm<sup>3</sup>, од које су потом припремљене серије разблажења концентрација 0,02, 0,05 и 0,1 mg/cm<sup>3</sup> како би се инхибиторна активност изразила и преко концентрација потребних да се инхибира 50% ACE-активности (IC<sub>50</sub>). У прелиминарним анализама прво је извршена оптимизација радног пуфера који је коришћен за припрему ензима, супстрата и разблажења узорака пептида. Наиме,

---

<sup>с</sup> Једна јединица (U) дефинисана је као она количина ангиотензин-конвертујућег ензима која катализује ослобађање 1 μmol хипурилске киселине из ННЛ-а по минути на 37 °C.

реакција је по протоколу изведена са два пуфера: 0,1 М натријум-боратним пуфером и 300 mM натријум-хлоридом (pH 8,3) и са 50 mM HEPES и 300 mM натријум-хлоридом (pH 8,3). Као радни пуфер даље је коришћен 50 mM HEPES са 300 mM натријум-хлоридом (pH 8,3). Потом, извршена је оптимизација ензимске реакције са аспекта времена трајања исте (два сата), као и времена инкубације по додатку *o*-фталалдехида, тј. ОРА реагенса (20 минута) праћењем промене апсорбанце на сваких 20 и/или 5 минута, редом. Свака реакција изведена је уношењем у систем 4 mU ангиотензин-конвертујућег ензима. Најпре је у микротитарској плочи извршена инкубација 0,020 cm<sup>3</sup> раствора ензима и 0,020 cm<sup>3</sup> узорка хидролизата и/или фракција пептида на 37 °C током 10 минута уз благо мешање. Реакција је започета додавањем 0,025 cm<sup>3</sup> ННЛ супстрата раствореног у радном пуферу 5mM концентрације. По додатку супстрата микротитарска плоча са узорцима инкубирана је два сата на 37 °C уз лагано мешање. Након инкубације узорка пептида са супстратом у HEPES пуферу и са АСЕ-ензимом, реакција се зауставља додавањем 0,20 cm<sup>3</sup> комерцијално припремљеног ОРА реагенса и читавају се вредности апсорбанци. Ослобођена хипурина киселина растворена у ОРА реагенсу апсорбује у UV-области са максимумом апсорпције на таласној дужини 340 nm. Очитане вредности апсорбанци у односу на радни пуфер коришћене су за израчунавање степена инхибиције активности АСЕ-ензима према једначини:

$$ACE (\%) = \left( 1 - \frac{A_{\text{узорак}} - A_{\text{бланк}}}{A_{\text{контрола}}} \right) \cdot 100 \quad (6.16)$$

где је,  $A_{\text{узорак}}$  измерена апсорбанца узорка хидролизата и/или фракције пептида протеина беланцета и позитивне контроле у испитаној реакцији,  $A_{\text{бланк}}$  измерена апсорбанца узорка хидролизата и/или фракција пептида протеина беланцета са радним пуфером и  $A_{\text{контрола}}$  измерена апсорбанца негативне контролне која је уместо узорка пептида у истој количини садржала радни пуфер. Такође, одређене су и вредности IC<sub>50</sub> за све узорке пептида са највећом активношћу припремањем серија разблажења од минимум 3, тако да је у овом случају IC<sub>50</sub> дефинисана као она концентрација пептида потребна да се инхибира 50% активности АСЕ-ензима.

Каптоприл, активни инхибитор ензима који конвертује неактивни ангиотензин I у активни облик, ангиотензин II, који се сматра једним од најјачих ендогених вазоконстриктора, коришћен је као стандард (позитивна контрола) за поређење инхибиторне активности. Једна таблета Катопил® (Галеника а.д., Република Србија)

која садржи 50 mg калтоприла уситњена је и екстрахована дејонизованом водом (крајња концентрација 1 mg/cm<sup>3</sup>), при чему је ради што веће ефикасности поступак екстракције узведен у ултразвучном купатилу фреквенце 40±2 kHz током 10 минута. Потом, екстракт је филтриран кроз асептичан филтер пречника 0,45 μm и припремљене су серије разблажења концентрације 0-100 μg/cm<sup>3</sup> које су коришћене за одређивање степена инхибиције активности АСЕ-ензима (Прилог 2). За поређење утицаја ултразвучног претретмана, ензимске хидролизе, састава и величине пептида коришћен је водени 10% раствор нетретираниог нативног беланцета, филтрираног и сведеног на исту концентрацију протеина као и анализирани узорци хидролизата и/или фракција пептида непосредно пре анализе.

### **6.3.17. Мерење антикоагулативне активности хидролизата и/или пептидних фракција**

За одређивање антикоагулативне активности хидролизата и/или изолованих фракција пептида протеина беланцета примењена је метода одређивања времена коагулације рекалцификоване плазме након додавања оптималне количине калцијума. У ту сврху коришћена је крвна плазма без тромбоцита (*на енгл.* platelet poor plasma, PPP) која се добија тако што се свежа цитратна крв (0,5 cm<sup>3</sup> 3,8% раствора Na-цитрата и 4,5 cm<sup>3</sup> крви) центрифугира 15 минута на 2500×g.<sup>218</sup> Издвојена плазма чувана је у фрижидеру на 2-8 °C до извођења експеримената.

Поступак анализирања започет је тако што је у микротитарској плочи помешано 0,05 cm<sup>3</sup> припремљене плазме са 0,05 cm<sup>3</sup> узорака хидролизата и/или фракција пептида (концентрације 1 mg/cm<sup>3</sup>) при чему је припремљена серија различитих разблажења коришћењем радног пуфера 10 mM HEPES-а са 0,15 mM NaCl (pH 7,4). Након тога, мултиканалном пипетом у сваки бунарчић са узорцима пептида додато је 0,05 cm<sup>3</sup> раствора CaCl<sub>2</sub> (25 mM) загрејаног на 37 °C. Одмах по додатку калцијум-хлорида, мерена је апсорбација на 670 nm, након чега су мерења настављена на сваки минут у наредних пола сата.<sup>219-220</sup> У овом истраживању, нагли пораст вредности апсорбанце након *lag* фазе указивао је на згрушавање крви. Као стандард за поређене антикоагулативне активности тј. као позитивна контрола коришћен је стандардни антикоагулант аспирин концентрације 0,4 mg/cm<sup>3</sup> (једна таблета Aspirin® 500 mg екстрахована је са 125 cm<sup>3</sup> радног пуфера), док су сва мерења у читачу микротитарских плоча (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer,

Thermo Scientific, САД) извршена наспрам радног пуфера. Утицај ултразвучног претретмана испитан је поређењем антикоагулативне активности са активношћу пептида ослобођених током конвенционалног третмана високом температуром, како и са радним пуфером HEPES-ом, коришћеним током припреме разблажења (негативна контрола). У циљу одређивања што прецизнијег и тачнијег времена коагулације рекалцификоване плазме, сви експерименти су изведени у трипликату, а резултати рекалцификационог времена представљени су као средње вредности.

### **6.3.18. Хроматографске технике пречишћавања и квантитативног карактерисања хидролизата и/или фракција пептида**

#### *6.3.18.1. Реверзно-фазна течна хроматографија под високим притиском (RP-HPLC)*

Припремљени хидролизати ултразвучно претретираних протеина беланцета и изоловане фракције пептида молекуларне масе мање од 10 kDa анализирани су реверзно-фазном хроматографијом под високим притиском на Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific уређају (Волтам, САД). Као стационарна (неполарна) фаза коришћена је реверзно-фазна C18 kolona (Hypersil gold 150 mm × 4,6 mm, 5 μm). Узорци пептида из протеинских хидролизата разблажени су 2 пута у дејонизованој води, док су узорци пептида из фракција били разблажени 10 пута. Инјекциона запремина износила је 0,015 cm<sup>3</sup>. Мобилну фазу чинили су: (А) вода и (Б) ацетонитрил са 0,1% (v/v) трифлуоросирћетном киселином. Елуирање је извршено при градијенту 5-50% Б 20 минута, затим 50-100% Б 5 минута за узорке хидролизата при протоку мобилне фазе 1 cm<sup>3</sup>/min. Градијент 0-10% Б коришћен је за раздвајање фракција пептида изолованих из хидролизата термички претретираних протеина беланцета при протоку мобилне фазе 0,4 cm<sup>3</sup>/min и 0,5 cm<sup>3</sup>/min за раздвајање фракција пептида изолованих из хидролизата ултразвучно претретираних протеина беланцета, током 15 минута. Ретенциона времена и површине пикова добијени су UV детекцијом на 210 nm, а сви резултати обрађени су коришћењем Chromeleon софтвера.

#### *6.3.18.2. Гел-филтрациона хроматографија*

Хидролизати протеина беланцета претретирани ултразвуком или високом температуром, као и изоловане ултрафилтрационе фракције пептида са најизраженим биолошким својствима (молекуларне масе 3-10 и 1-3 kDa) анализирани

су и/или даље раздвојени применом гел-филтрационе хроматографије како би се одредила расподела молекулских маса пептида и сакупљене ултрафилтрационе фракције пречистиле издвајањем нових биолошки активних фракција. Узорци пептида протеина беланцета пропуштени су кроз стаклену колону под притиском (250×15 mm, Omnifit® Labware Column, Sigma Aldrich, St. Louis, САД) напуњену стационарном фазом која молекуле пептида раздваја по њиховој величини, тј. молекулској маси. У ту сврху коришћена је комерцијално припремљена суспензија, тј. гел-филтрациони матрикс под именом Toyopearl HW-40F (величина пора 50 Å, пречник честица 45 µm; Tosoh Bioscience GmbH, Штутгарт, Немачка), метакрилни полимер са уведеним хидроксилним групама чија је моћ раздвајања пептида молекулске масе 0,1-10 kDa. Суспензија пуњења припремљена је и испирана у складу са упутством произвођача након чега је, при протоку, колона њоме напуњена. За уравнотежавање колоне и елуирање коришћена је мобилна фаза 50 mM фосфатни пуфер са 150 mM NaCl (pH 7,0; дезаерисан), док је проток 0,8 cm<sup>3</sup>/min подешен на основу хидродинамичког притиска и одржаван је константним током уравнотежавања. Фракције пептида сакупљене су коришћењем фракционог колектора (Buchi Labortechnik AG, Швајцарска) у временском интервалу 2 минута, а садржај протеина у току раздвајања праћен је променом апсорбанце на таласним дужинама 214 и 280 nm користећи UV-Vis детектор (Buchi Labortechnik AG, Швајцарска).

По завршетку уравнотежавања колоне приступило се њеном калибрисању користећи стандарде познатих молекулских маса као референтних узорака: лизозим (14300 Da), инсулин (5800 Da), хипурил-L-хистидин-L-леуцин (429,47 Da), редуковани L-глутатион (307,32 Da), фениланин (165,19 Da) и L-леуцин (113,17 Da). Плави декстран (2000 kDa) коришћен је за одређивање празне запремине колоне. Сви стандарди заједно су инјектовани на колону, а припремљени су растварањем у фосфатном пуферу сваки при концентрацији 2 mg/cm<sup>3</sup>. Радна висина колоне, односно висина пуњења износила је 22 cm, а узорци пептида протеина беланцета (хидролизата и/или фракција пептида) и стандарда инјектовани су на колону у концентрацији 1% од укупне запремине колоне. Пре nanoшења на колону узорци пептида протеина беланцета како из хидролизата тако и из фракција филтраирани су кроз стерилни филтер 0,25 µm. Проток током елуирања пептида је одржаван константним 0,5 cm<sup>3</sup>/min. Раздвајање узорака завршено је онда када је у неколико

узастопних фракција концентрација протеина била занемарљива, тј. када детекцијом није забележено повећање вредности очитаних апсорбација на обе таласне дужине. По завршеном раздвајању колоне је испрана мобилном фазом (2-3 запремине колоне), затим 20 mM раствором NaOH (1 запремина колоне) после кога се пропушта 20% (*v/v*) раствор етанола у коме се колоне и оставља на чување како не би дошло до контаминирања и/или исушивања.

### **6.3.19. Статистичка анализа експерименталних резултата**

Сви експерименти су изведени у трипликату, а резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација за свако мерење. У току анализе података, а у циљу процене статистичког значаја резултата коришћена је и анализа варијансе (ANOVA; OriginPro 9.0, OriginLab Corp., Mass., САД). У зависности од броја параметара чији је утицај испитиван за поређење аритметичких средина, коришћена је једнострука (One-way ANOVA) или двострука анализа варијансе (Two-way ANOVA) са накнадним Tukey и/или Student's тестовима. За одређивање значајности разлика између појединих експерименталних група статистички значајном сматрана је вероватноћа на различитим нивоима и то: 1) Tukey тест  $p < 0,05$ , 2) Студентов  $t$ -тест  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  и  $p < 0,05$ . Линеарна корелације између различитих параметара испитивана је коришћењем статистичког софтвера SPSS 13.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## 7. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Ензимска хидролиза протеина беланцета показала се као ефикасан начин унапређења и побољшања њихових својстава као што су повећање растворљивости, стабилности, дигестивности, али и смањења нежељене алергености уз очување њихове високе нутритивне и биолошке вредности.<sup>221</sup> Међутим, производња хидролизата протеина беланцета као суплемената функционалне хране и протеинских биофармацеутика захтева примену иновативних, мање инвазивних технологија због њихове осетљивости на различите факторе процесирања који доводе до губитка нутритивних и биолошких вредности, као и хемијске деградације. Наведено је неопходно и због присуства специфичних инхибитора серинских протеаза у нативном беланцету, нпр. овомукоид, како би се повећала активност коришћене протеазе.

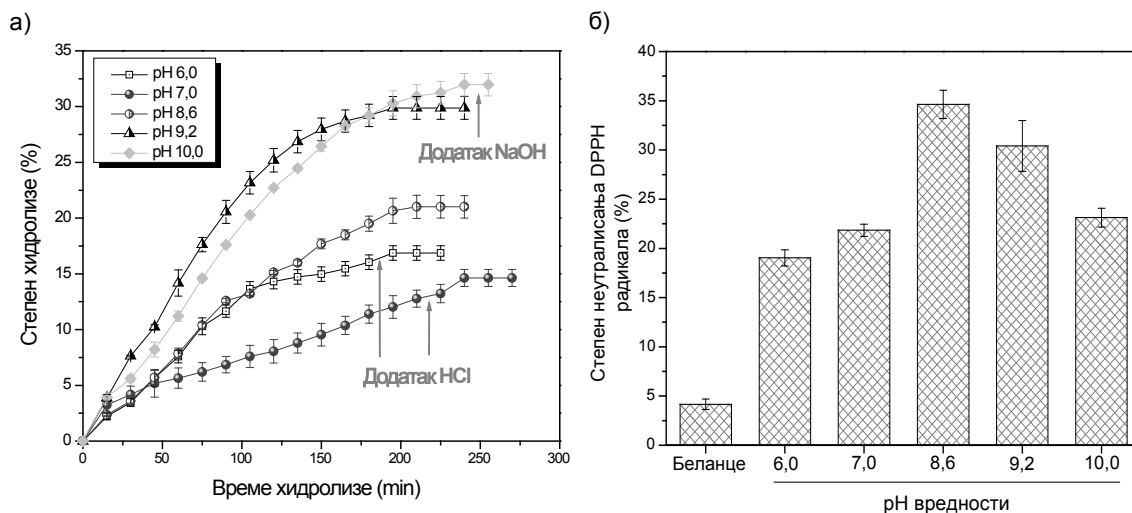
### 7.1. ЕНЗИМСКА ХИДРОЛИЗА ПРОТЕИНА БЕЛАНЦЕТА У ШАРЖНОМ РЕАКТОРУ СА МЕХАНИЧКИМ МЕШАЊЕМ

Како је основни предмет научног истраживања ове докторске дисертације био развој иновативног ензимског поступка производње биолошки активних пептида, њихово изоловање и карактеризација, прва фаза истраживања била је усмерена на развој ензимског поступка хидролизе и оптимизацију ултразвучног претретмана као алтернативу традиционалном термичком претретману протеина беланцета. У оквиру ове фазе истраживања посебна пажња посвећена је оптимизацији ензимске хидролизе протеина беланцета применом различитих врста протеолитичких ензима у једноступеном и двоступеном ензимском поступку, као и оптимизацији процесних параметара и начина извођења ензимске хидролизе ултразвучно претретраних протеина беланцета. Том приликом испитана је примена различитих ултразвучних претретмана на ефикасност ензимске хидролизе варирањем услова извођења: калориметријска снага и фреквенца ултразвучних таласа, дужина трајања ултразвучног претретмана и рН вредност полазног раствора нативних протеина беланцета. Додатно, испитана је кинетика ензимске реакције у шаржном реакторском систему и усвојен је математички кинетички модел хидролизе протеина беланцета, који ваљано описује ток ензимске реакције у циљу добијања хидролизата побољшаних биолошких својстава у односу на нативне протеине беланцета.



### 7.1.1. Утицај рН вредности протеина беланцета на ензимску хидролизу

Промена рН супстрата често доводи до денатурације молекула протеина услед промене расподеле наелектрисања и конформације молекула. Ове промене последично утичу и на ултразвучни претретман који изазивајући такође промене у структури молекула олакшава приступачност протеолитичких ензима ка унутрашњим пептидним везама.<sup>222-223</sup> Како денатурација протеина изазвана ултразвучним таласима зависи од температуре и рН, у прелиминарним истраживањима утицај ултразвучног претретмана испитан је при константној температури и рН у опсегу 6,0-10,0. Циљ ове оптимизације био је проналажење услова који ће довести до преверзибилне денатурације инхибитора алкалазе, али не и до формирања компактних преципитата протеинског супстрата. За ову сврху, рН полазних раствора нативних протеина беланцета подешена је додатком 1 М раствора NaOH или 1 М раствора HCl након чега су узорци подвргнути дејству ултразвучних таласа у купатилу фреквенце 35 kHz током 30 минута. По завршетку претретмана, узорци су хидролизовани једноступеним ензимским поступком са алкалазом, и хидролизати окарактерисани са аспекта оствареног степена хидролизе и антиоксидативне активности, а добијени резултати приказани су на Слици 7.1.



**Слика 7.1.** Утицај рН вредности супстрата током ултразвучног претретмана на ензимску хидролизу протеина беланцета: а) степен хидролизе у функцији времена при различитим рН вредностима, б) степен неутралисања DPPH радикала хидролизата протеина беланцета припремљених при различитим рН вредностима (претретман у ултразвучном купатилу: фреквенца 35 kHz, 30 минута, 25 °C; ензимска хидролиза: 55 °C, рН 8,0, концентрација супстрата – 10%, масени однос  $E/S$  – 2,5%).

Резултати прелиминарне фазе истраживања јасно упућују да је у опсегу испитаних рН вредности претретман ултразвучним таласима фреквенце 35 kHz утицао на повећање доступности молекула протеина беланцета и да је повећање равнотежног степена хидролизе ( $DH$ ) примећено након ултразвучног претретмана у киселој и/или алкалној средини (*резултати нису приказани*). Уочен позитиван ефекат ултразвучног претретмана на ензимску хидролизу у складу је са литературним повећањем доступности протеина беланцета за хидролизу алкалазом 2,7 пута након 120 минута третмана ултразвучним таласима фреквенце 40 kHz.<sup>224</sup> Повећана доступност молекула супстрата може се приписати делимично развијеној конформацији протеина услед соницирања. Додатно, дејством ултразвучних таласа долази до хемолитичког цепања молекула воде<sup>f</sup> при чему се образују реактивни интермедијери, слободни радикали, као што су: хидроксил радикал и атомски водоник, узрокујући структурне промене протеина беланцета.<sup>222</sup>

Евидентно је да повећање рН вредности протеина беланцета позитивно утиче на брзину ензимске реакције хидролизе, као и њен даљи ток, и да је при рН вредности 9,20 (природно алкално беланце без подешавања алкалности) забележен висок равнотежни степен хидролизе  $29,9 \pm 1,76\%$ , за разлику од нижих рН вредности (Слика 7.1a). Овакав утицај највероватније је последица деловања одбојних међумолекулских сила при већим рН вредностима због чега су значајно смањене агломерација и флукуација протеина беланцета. Такође, запажа се да је утицај рН вредности беланцета на ензимску хидролизу двострук, па је у првом случају додаток базе пре ултразвучног третмана (узорак рН 10,0) негативно утицао на накнадну хидролизу. У другом случају, додатком киселине (узорици рН 6,0 и 7,0) пре соницирања супстрат је постао чак и до три пута мање подложен ензимској хидролизи, како са аспекта брзине реакције, тако и са аспекта оствареног степена хидролизе. Литературно, рН свежег беланцета је у опсегу 7,6-8,5 и повећава се у зависности од температуре и временског периода складиштења до максималне вредности 9,7, при чему већ након трећег дана чувања на 3 °C та вредности износи 9,18. Повећање рН вредности последица је губитка  $CO_2$  кроз поре љуске јајета, а зависи од степена растворљивости  $CO_2$ , присуства бикарбонатних и карбонатних јона и равнотеже протеина.<sup>19, 225</sup> Добијени резултати (Слика 7.1a) указују да је

---

<sup>f</sup> Хемолита представља раскидање ковалентне везе у молекулима воде услед ког настају слободни радикали ( $H_2O \rightarrow OH + H^+$ ;  $2OH + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + H^+$ ).

остварен готово 2 пута већи равнотежни степен хидролизе и већа почетна брзина реакције узорка беланцета након складиштења (узорак рН 9,20) у односу на узорак свежег беланцета (узорак рН 8,6). Приказана зависност рН протеина беланцета и степена хидролизе указује на чињеницу да је неопходно користити беланце издвојено из свежих јаја и/или јаја која су складиштена до три дана, што је од изузетног практичног значаја.

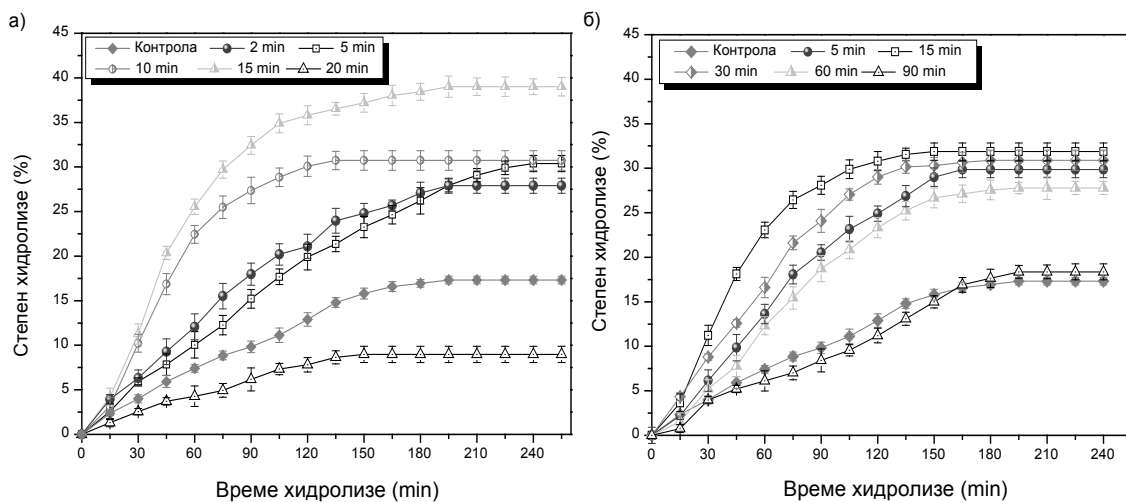
У овој прелиминарној фази истраживања, биолошка активност хидролизата протеина беланцета тестирана је мерењем способности неутралисања радикала, односно методом којом се одређује склоност антиоксиданата да донирају атом водоника слободном DPPH<sup>•</sup> радикалу који има један неспарен електрон.<sup>226</sup> Степен неутралисања DPPH<sup>•</sup> радикала добијених хидролизата (Слика 7.1б), побољшан је ултразвучним претретманом и накнадном хидролизом и то чак 7 пута за узорак рН 8,6 у поређењу са нетретираним свежим нативним беланцетом. Конкретно, постигнут степен неутралисања износи  $34,6 \pm 1,44\%$ . Соницирањем нативних протеина беланцета након складиштења (узорак рН 9,20) и накнадном хидролизом не запажа се значајније испољавање антиоксидативне активности у поређењу са узорком рН 8,6 ( $p < 0,05$ ). Код хидролизата припремљених соницирањем нативних беланцета при рН 6,0, 7,0 и 10,0 уочљив је значајан пад антиоксидативне активности у односу на претходне хидролизате, те се закључује да ове рН вредности нису подстакле додатно ослобађање биоактивних пептида. Наведено је највероватније последица ултразвучног претретмана у киселим условима при којима је структурна модификација мање изражена у поређењу са алкалном средином, што је на основу доступних литературних података потврђено и идентичним претретманом изолата протеина грашка.<sup>227</sup> Додатно, уочен утицај рН 10,0 највероватније је последица смањене концентрације водоникових атома у алкалној средини, због чега се и смањује способност донирања водоника слободном DPPH<sup>•</sup> радикалу. Ипак, побољшана антиоксидативна активност хидролизата протеина беланцета при вишим равнотежним степенима хидролизе приписује се повећаном способности ослобођених биолошки активних олигопептида да донирају атом водоника слободном хидрофобном радикалу преводећи га у стабилнији производ чиме ови пептиди заустављају ланчану реакцију радикала.<sup>228</sup> Уочена зависност равнотежног степена хидролизе и способности неутралисања DPPH<sup>•</sup> радикала у складу је са резултатима истраживања хидролизе протеина различитог порекла, нпр. протеина из

окаре (сојина сурутка),<sup>229</sup> протеина соје,<sup>230</sup> беланцета,<sup>231</sup> пшеничног глутена,<sup>232</sup> обезмашћеног семена мака<sup>233</sup> и кикирикија,<sup>234</sup> пиринчаних мекиња,<sup>235</sup> протеинских нуспроизводи морске сипе<sup>236-237</sup>, али и многих других.

Генерално, може се констатовати да узајамни утицај ултразвучног претретмана протеина беланцета при рН вредности 8,60 (протеини свежег беланцета) и накнадне ензимске хидролизе са алкалазом при оптималним реакционим условима пружају нови приступ за модификацију протеина у што вредније и квалитетније хидролизате унапређених биолошких својстава, те је стога наведена рН беланцета усвојена за даљи ток истраживања.

### **7.1.2. Утицај интензитета и параметара ултразвучног претретмана на ензимску хидролизу протеина беланцета**

Полазећи од корелације између структурних промена пречишћених модел протеина беланцета – овалбумина и лизозима и ефикасност ензимске хидролизе,<sup>238</sup> у првој фази оптимизације биотехнолошког поступка хидролизе структурне промене нативних протеина беланцета проузроковане ултразвучним третманом проучене су са аспекта доступности ензимској хидролизи. Том приликом испитан је утицај интензитета и параметара ултразвучног претретмана на ензимску хидролизу. Конкретно, посматран је утицај врсте, амплитуде и фреквенце ултразвучног претретмана, односно употреба различитих конфигурација уређаја за соникацију, као и ефекат начина извођења ултразвучног претретмана, односно дужине трајања претретмана и калориметријске снаге примењеног ултразвука. За ову сврху, узорци нативних протеина беланцета соницирани су у ултразвучном воденом купатилу фреквенце  $40 \pm 2$  kHz у трајању од 5, 15, 30, 60 и 90 минута, али и ултразвучном сондом која емитује таласе фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz током 2, 5, 10, 15 и 20 минута. По завршетку ултразвучног претретмана узорци су хидролизоване једностепеним ензимским поступком применом алкалазе у реактору са механичким мешањем, припремљени хидролизати су окарактерисани са аспекта тока реакције и оствареног степена хидролизе, а добијени резултати представљени су на Слици 7.2.



**Слика 7.2.** Ток ензимске хидролизе нативних протеина беланцета у функцији интензитета и параметара ултразвучних претретмана: а) утицај дужине трајања претретмана протеина беланцета ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz, максималне амплитуде 40% и интензитета  $22,8 \text{ W/cm}^2$ , б) утицај дужине трајања претретмана протеина беланцета у ултразвучном купатилу фреквенце  $40 \pm 2$  kHz и интензитета  $1,12 \text{ W/cm}^2$ . Услови ензимске хидролизе:  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 8,0, 10% раствор супстрата, масени однос  $E/S - 2,5\%$ .

Претретман протеина беланцета ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz, максималне амплитуде 40% и интензитета  $22,8 \text{ W/cm}^2$  утицао је на промену тока ензимске реакције за све испитане дужине трајања претретмана, с тим што су знатно ( $p < 0,05$ ) већи степени хидролизе и почетне брзине остварени након 10 и 15 минута у поређењу са контролним узорком хидролизата (Слика 7.2а). Хидролизат са највишом вредношћу степена хидролизе  $39,01 \pm 0,98\%$  добијен је након петнаестоминутног излагања ултразвучним таласима, док је краће време (2 и 5 минута) допринело чак 15% нижој вредности степена хидролизе. Продужено време соницирања од 20 минута неповољно је утицало на ток реакције хидролизе смањујући почетну брзину, као и остварен равнотежни степен хидролизе. Повећана доступност молекула протеина беланцета ензимској хидролизи може да буде приписана конформационим променама проузорокованим кавитационим ефектом ултразвучне сонде, који доводи до потпуног или делимичног разматавања полипептидних ланаца и већег излагања пептидних веза из унутрашњости молекула. Такође, претретман у ултразвучном купатилу фреквенце  $40 \pm 2$  kHz и интензитета  $1,12 \text{ W/cm}^2$  довео је до унапређења ензимске хидролизе у поређењу са контролним узорком хидролизата у којем нативни протеини беланцета нису били претретраним (Слика 7.2б). Евидентно је да,

међусобним поређењем, време претретмана (осим испитаних 90 минута) није значајно ( $p > 0,05$ ) утицало на крајњи остварен степен хидролизе чија максимална вредност износи  $31,88 \pm 0,98\%$ . Међутим, може се запазити значајно ( $p < 0,05$ ) повећање почетне брзине реакције хидролизе након 5 и 15 минута, док са дужим временским излагањем ултразвучним таласима (30, 60 и 90 минута) почетне брзине реакције хидролизе протеина беланцета се смањују. Претпоставља се да је негативан ефекат дужег излагања ултразвучним таласима (20 минута код претретмана УС-20 kHz и 90 минута код претретмана УК-40 kHz) последица формирања протеинских агрегата у чијем присуству је дејство алкалазе смањено и отежано. Наведено је у сагласности са резултатима истраживања ефекта дужине трајања третмана у ултразвучном купатилу фреквенце 40 kHz на протеине изолата сурутке где продужено време соницирања подстиче стварање агрегата молекула протеина.<sup>16</sup> Стога се као оптимално време претретмана, за постизање високих равнотежних степена хидролизе протеина беланцета хидролизованых једностепеним поступком са алкалазом, може усвојити 15 минута за обе врсте ултразвучних уређаја, пошто је у поређењу са контролном хидролизатом забележено повећање почетне брзине реакције и степена хидролизе 2,86 пута и за 14,5%, редом код претретмана у ултразвучном купатилу и 3,15 пута и за 21,7%, редом код претретмана ултразвучном сондом. У сличном истраживању, након 8 минута ултразвучног третмана остварен је 13,3% већи степен хидролизе концентрата протеина млека у односу на контролу у реакцији катализованој оризином, алкалном протеазом из *Aspergillus melleus*.<sup>239</sup> Исто тако, ултразвучним претретманом повећава се степен хидролизе зеина, преобладајућег протеина зрна кукуруза, за 11,5% у односу на контролу као последица структурних и површинских промена протеина зеина изазваних соницирањем.<sup>240</sup> При десетоминутном излагању ултразвучним таласима показано је да се значајно смањује енергетска баријера потребна за реакцију ензимске хидролизе обезмасћених протеина пшеничних клица и побољшава почетна брзина реакције.<sup>134</sup>

Насупрот наведеном слагању, приказани резултати значајно одступају од литературних у којима је евидентно да ултразвучни претретман модел протеина овотрансферина, хидролизованог термолизином, није довео до веће доступности протеина ензимској хидролизаци, иако је показано да је садржај реактивних сулфхидрилних група повећан.<sup>147</sup> Претпоставља се да је наведено неслагање последица коришћења нативних протеина беланцета као супстрата за припрему

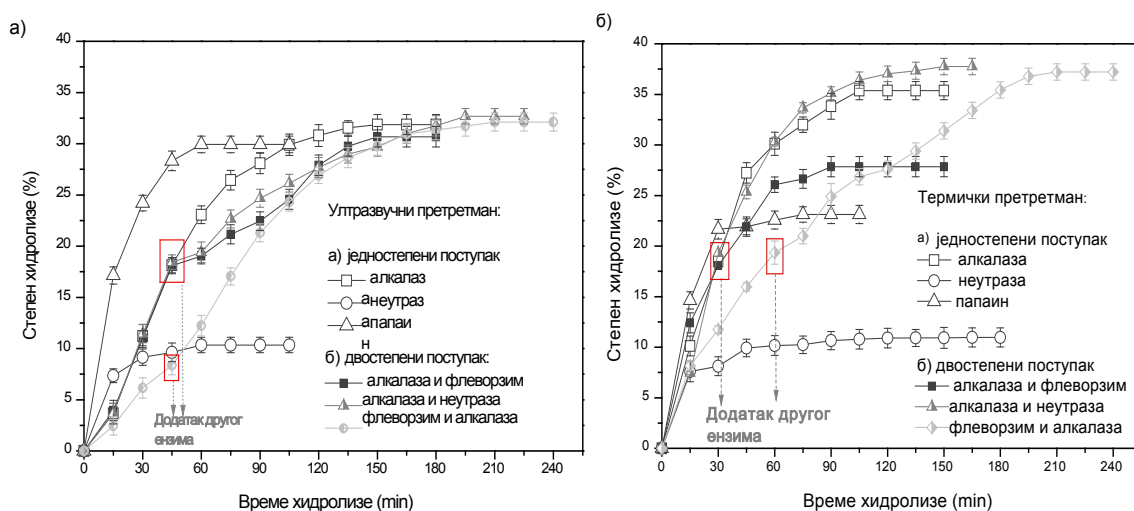
хидролизата, чији је најзаступљенији протеин овалбумин. Узимајући у обзир структурне разлике овалбумина и овотрансферина, односно чињеницу да овалбумин поседује једну дисулфидну везу у поређењу са овотрансферином који их има 15 и С-гликански ланац који стабилизује његову тродимензионалну структуру, уочено неслагање може се приписати већој отпорности овотрансферина ка ултразвучним таласима у поређењу са овалбумином.

На основу дискутованих резултата засигурно се може констатовати да је механизам деловања ултразвучних таласа на денатурацију протеина беланцета специфичан и сложен, да зависи од аминокиселинског састава и конформације протеина, али и конфигурације уређаја за соникацију и медијума унутар кога се врши пренос ултразвучних таласа. Додатно, сувише интензиван третман ултразвуком доводи до интермолекулских интеракција протеина беланцета, њиховог агрегирања, и последично до повећања честица, чинећи пептидне везе унутар агрегираних молекула недоступним за протеазу. Због тога је од изузетне важности било испитивање корелације између интензитета и параметара ултразвучног претретмана, тока ензимске хидролизе и оствареног степена хидролизе из које је евидентно да ултразвучни претретман изведен сондом у дужини трајања 15 минута, при мањој фреквенци и знатно вишем интензитету у поређењу са ултразвучним купатилом доводи до веће конформационе покретљивост молекула протеина беланцета и вишој доступност ензимској хидролизи.

### **7.1.3. Оптимизација ензимске хидролизе протеина беланцета применом различитих врста протеолитичких ензима у једностепеном и двостепеном ензимском поступку**

Двостепена или вишестепена ензимска хидролиза протеина све више се намеће као најефикасније технолошко решења за добијање хидролизата тачно дефинисаних нутритивних и биолошких својстава, као што су хидролизати казеина, сурутке и неких биљних протеина.<sup>241</sup> Стога, у следећој фази оптимизације биотехнолошког поступка хидролизе протеина беланцета приступило се примени оваквог ензимског поступка за добијање хидролизата, тј. смеше полипептида различитих дужина ланца, изведеног у две фазе. Прва фаза подразумевала је парцијалну хидролизу ултразвучно и/или термички претретираних нативних протеина беланцета иницирану додатком ендо-пептидазе. Друга фаза представљала је накнадну хидролизу вршену додатком екто-пептидазе и том приликом испитан је и утицај

промене редоследа додавања протеаза. Упоредо, у једноступеном поступку испитан је утицај врсте протеолитичких ензима, алкалазе, неутразе и папаина. Непосредно пре хидролизе, нативни протеини беланцета третирају се ултразвучним таласима фреквенце  $40 \pm 2$  kHz при оптимално усвојеној дужини трајања од 15 минута (одељак 7.1.2). Ради поређења, нативни протеини беланцета третирају се конвенционалним термичким третманом. По завршетку претретмана узорци су хидролизоване на начин објашњен у одељку 6.3.4 у реактору са механичким мешањем, затим су припремљени хидролизати окарактерисани са аспекта тока реакције, оствареног степена хидролизе и антиоксидативне активности. Графичко поређење експерименталних криви добијених током једноступеног и двоступеног ензимског поступка хидролизе протеина беланцета представљено је на Слици 7.3.



**Слика 7.3.** Ток ензимске хидролизе нативних протеина беланцета у функцији врсте протеолитичких ензима применем једноступеног и двоступеног ензимског поступка: а) утицај претретмана протеина беланцета у ултразвучном купатилу фреквенце  $40 \pm 2$  kHz и интензитета  $1,12 \text{ W/cm}^2$  током 15 минута и б) утицај термичког претретман  $75 \text{ }^\circ\text{C}$ –30 минута на ефикасност хидролизе.

У зависности од примењеног претретмана лако се запажа да ток ензимске хидролизе, као и почетна брзине реакције варирају у односу на специфичност коришћене ендо- и егзо-пептидазе, афинитет ензима према супстрату и начина извођења ензимског поступка. Поређењем експерименталних резултата приказаних на Слици 7.3, применем једноступеног ензимског поступка може се приметити идентичан тренд кривих хидролизе за ултразвучни и термички претретман, при чему су највише вредности степена хидролизе пептидних веза постигнуте алкалном протеазом из *B. licheniformis*,  $31,89 \pm 0,98$  и  $35,37 \pm 0,89\%$ , редом. Значајно нижи ( $p < 0,05$ )



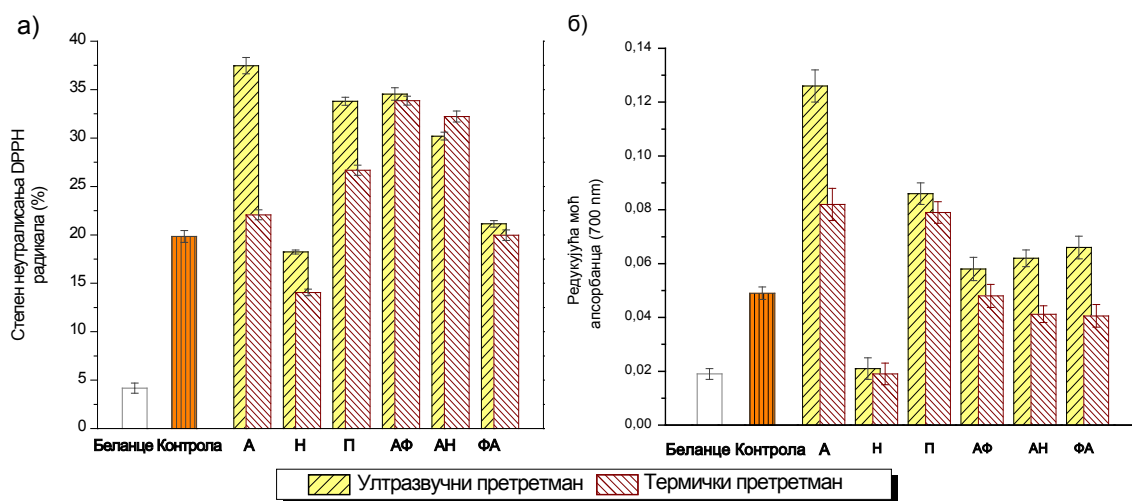
степен хидролизе остварени су применом ендо-пептидаза папаина и неутразе, при чему су међусобним поређењем већи степен хидролизе остварени применом ултразвучног претретмана. Овакав резултат је и очекиван због чињенице да алкалаза на пептидне везе молекуле протеина беланцета, делимично денатурисаних ултразвучним таласима или високом температуром, делује без реда у унутрашњости молекула, разлагајући их насумично на полипептиде мање молекулске масе. У случају ултразвучног претретмана, почетна брзина реакције катализована папаином је знатно већа у поређењу са брзином реакције катализована алкалазом (Слика 7.3а), тако да је у првих 30 минута уочен велики афинитет папаина према супстрату и степен хидролизе пептидних веза од  $24,2 \pm 0,76\%$ . У том случају, већ након 60 минута постигнут је равнотежни степен хидролизе  $29,93 \pm 0,81\%$ . Међутим, применом термичког претретмана ова разлика почетних брзина реакција катализованих папаином и алкалазом је незнатна (Слика 7.3б). Хидролизом ултразвучно претретраних протеина беланцета неутразом након 60 минута остварује се равнотежни степен хидролизе  $10,34 \pm 0,75\%$  и успостављано је равнотежно стање, док је хидролизом термички претретраних протеина равнотежа померена и тек након 165 минута успостављено је равнотежно стање са равнотежним степеном хидролизе  $10,97 \pm 0,94\%$ . Дискутовани резултати у сагласности су са литературни подацима према којима се најмањи равнотежни степен хидролизе протеина сурутке постиже неутразом, у поређењу са флеворзимом и алкалазом, који су допринели хидролизаци пептидних веза у већем проценту дајући полипептиде краћих аминокиселинских ланаца.<sup>242</sup> Насупрот овим резултатима, хидролиза биљних протеина семена лана,<sup>243</sup> соје,<sup>244</sup> кикирикија,<sup>245</sup> катализована папаином била је незнатна, односно папаин је довео до раскидања пептидних веза од свега неколико процената. Теоријски је познато да каталитичка активност протеаза варира у зависности од њиховог порекла, специфичности према супстрату, активног места, каталичког механизма, рН и температурног оптимума, као и то да је специфичност супстрата индикована према жељеној аминокиселини у полипептидном ланцу где протеаза раскида пептидну везу.<sup>246</sup> Доказано је такође да папаин испољава и егзо-пептидазну активност ослобађајући аминокиселине са С-краја, хистидин и треонин.<sup>247</sup> Већи равнотежни степен хидролизе остварен алкалазом, поредећи криве хидролизе алкалазе и папаина претретраних протеина беланцета при истим условима (Слика 7.3), може се приписати насумичном раскидању пептидних веза богатих у бочном низу

ароматичним аминокиселинским остацима за разлику од селективног деловања папаина, који најчешће раскида пептидне везе састављене од аминокиселина са базним бочним низом, нарочито аргинином и лизином.<sup>246</sup> Студије су показале да алкалаза има и способност раскидања пептидних веза које садрже хидрофобне аминокиселине на својим крајевима, али исто тако и пептидне везе на С-крају богате у бочном низу остацима глутаминске и аспарагинске киселине.<sup>248</sup> Додатно, добијени резултати могу се тумачити као последица различитог каталитичког механизма алкалазе, папаина и неутразе, јер је познато да алкалне протеазе као што је алкалаза поседују већу протеолитичку активност, у поређењу са неутралним протеазама какве су папаин и неутраза.<sup>249</sup>

Поређењем тока хидролизе ултразвучно претретираних протеина беланцета у двостепеном поступку (Слика 7.3а) запажа се да су највеће почетне брзине и највиши равнотежни степени хидролизе остварени комбинацијом протеолитичких ензима ендо-пептидазне активности алкалазе и неутразе. Извођењем двостепеног ензимског поступка комбиновањем алкалазе и флеворзима, као и променом редоследа додавања наведених протеаза, у поређењу са поступком изведеним са алкалазом и неутразом, не уочавају се значајне разлике ( $p > 0,05$ ) у постигнутом равнотежном степену хидролизе, тако да се са овог аспекта било која комбинација може сматрати адекватном за припрему хидролизата са високим садржајем полипептида краћих аминокиселинских ланаца. Интересантно је запажање да у једноступеном поступку неутраза није довела до значајнијег раскидања пептидних веза, али да је у двостепеном поступку и те како допринела својом ендопептидазном активношћу високом степену хидролизе како ултразвучно, тако и термички претретираних протеина беланцета. Евидентно је да су равнотежни степени хидролизе термички претретираних протеина беланцета у двостепеним поступцима алкалаза и неутраза, флеворзим и алкалаза значајно већи ( $p < 0,05$ ) у поређењу са ултразвучним претретманом. Претпоставља се да је овакав резултат последица иреверзибилне термичке денатурације протеина беланцета, а уједно и делимичне хидролизе током излагања високој температури, чиме је доступност пептидних веза протеазама значајно повећана, што се може уочити и већим почетним брзинама реакције хидролизе. Флеворзим, протеаза из *A. oryzae* са двостуком, ендо- и егзо-пептидазном, активношћу показала се као изузетно погодна и онда када је редослед додавања протеаза, алкалазе и ње, промењен. Ова протеаза веома је ефикасна због своје

специфичности и деловања на крајевима пептиног ланца при чему ослобађа аминокиселине са C-краја, због чега се често користи за припрему хидролизата смањене горчине и повећане сварљивости, као и у третманима који значајно утичу на побољшање укуса прехранбених производа.<sup>250-251</sup> Неке студије истичу да флеворзим хидролизује протеине ослобађајући пептиде малих молекулских маса и слободне аминокиселине,<sup>64</sup> због чега управо његова комбинација са алкалазом се може користити за добијање хидролизата богатих пептидима малих молекулских маса.

Како би се протеини беланцета модификовали ензимском хидролизом у што вредније и квалитетније хидролизате, од изузетне важности је било припремити хидролизате који ће имати не само висок степен хидролизе и задовољавајућу почетну брзину реакције, већ и извесну антиоксидативну активност. Антиоксидативна активност хидролизата протеина беланцета припремљених једностепеним и двестепеним ензимским поступком, у овој прелиминарној фази истраживања, испитана је мерењем редукујуће моћи и степена неутралисања DPPH радикала при истој концентрацији протеина. Резултати су упоређени са нетретираним нативним протеинима беланцета (*беланце на графикону*) и контролним узорком хидролизата добијеног хидролизом нетретираних нативних протеина беланцета алкалазом (*контрола на графикону*) и графички приказани на Слици 7.4.



**Слика 7.4.** Антиоксидативна активност хидролизата протеина беланцета добијених током једностепеног и двостепеног ензимског поступка хидролизе применом различитих врста протеолитичких ензима алкалазе (А), папаина (П), неутразе (Н) и комбинација алкалаза и флеворзим (АФ), алкалаза и неутраза (АН) и флеворзим и алкалаза (ФА): а) степен неутралисања DPPH радикала и б) редукујућа моћ.

Резултати антиоксидативне активности (Слика 7.4) указују да су ензимском хидролизом протеина беланцета, примењујући оба технолошка поступка, произведени хидролизати значајно већих вредности степена неутралисања DPPH радикала и редукујуће моћи у поређењу са вредностима нетретираних нативних протеина беланцета. Исти резултати значајно ( $p < 0,05$ ) су бољи за хидролизате припремљене од ултразвучно претретираних протеина беланцета у односу на термички претретирани и контролни узорак хидролизата. Уопштено, тумачењем резултата (Слика 7.4а) запажа се да хидролизати протеина беланцета претретираних ултразвучним таласима фреквенце  $40 \pm 2$  kHz добијени хидролизом са алкалазом у једноступеном поступку, али и алкалазом и флеворзимом у двоступеном поступку потенцијално садрже највише биолошки активних пептида. Конкретно, степен неутралисања DPPH радикала за ова два хидролизата износио је  $37,470 \pm 0,840$  и  $34,542 \pm 0,643$  %, редом, при концентрацији протеина од  $1,2 \text{ mg/cm}^3$ . Познато је да антиоксидативна активност протеинских хидролизата изузетно зависи од аминокиселинског састава и секвенце пептида на које утичу реакциони услови процеса хидролизе, али и сам извор протеина, односно врста нативних протеина из којег се изолују пептиди.<sup>61</sup> Висока антиоксидативна активност хидролизата припремљеног двоступеним ензимским поступком са алкалазом и флеворзимом претпоставља може се преписати специфичним променама у аминокиселинском саставу при чему се на основу литературних навода може истаћи да је садржај неких основних и хидрофобних аминокиселина значајно побољшан.<sup>93</sup> У поређењу са једноступеним ензимским поступком изведеним алкалазом и папином примењујући ултразвучни претретман, двоступени поступци изведени алкалазом и неуразом и флеворзимом и алкалазом нису довели до значајнијег унапређења степена неутралисања DPPH радикала. Такође, разматрајући примењене претретмане у оба технолошка поступка, класичан термички поступак третирања на високој температури је условио нарушавање антиоксидативне активности, под претпоставком да је довео до одвијања сложене Милардове реакције за чије је одвијање неопходно присуство карбонилне групе (нпр. редукујући шећер) и слободне амино групе протеина беланцета. Познато је беланцете садржи мали удео глукозе ( $\leq 0,07\%$ ) и може се претпоставити да она реагује са остацима лизина и аминокиселинским остацима на *N*-терминалном крају добијених пептида након ензимске хидролизе, утичући на тај начин на одвијање термичке реакције редукације

шећера аминокиселинама.<sup>252-253</sup> Додатно, доказано је да термички третман као уобичајени начин пастеризације и обраде беланаца делимично уништава вредне састојке беланцета и доводи до промена у структури аминокиселина. При томе се уништава значајни део цистеина, лизина и аргинина, а расположивост других аминокиселина се такође битно смањује, последично доводећи до смањења биолошке активности насталих пептида. Исто тако, може се рећи да је термички претретман довео и до неселективне и неконтролисане хидролизе протеина беланцета, као и њихове пререзибилне денатурације, тако да је значајно утицао на смањење биолошке вредности производа.

Хидролизат ултразвучно претретираних протеина беланцета добијен у једноступеном поступку хидролизе са алкалазом показао је највећу редукујућу моћ у поређењу са осталим тестираним хидролизатима припремљених једноступеним и/или двоступеним поступком. У поређењу са нативним беланцетом и контролним хидролизатом, хидролизат алкалазе остварио је повећање од 0,107 и 0,103 апсорпционих јединица, редом. Широко је прихваћена чињеница да што је већа вредност апсорбанце измерена на 700 nm, већа је и редукујућа моћ протеинских хидролизата.<sup>254</sup> Запажа се да су вредности степена неутралисања DPPH радикала (Слика 7.4а) хидролизата ултразвучно претретираних протеина беланцета добијених једноступеним поступком у доброј корелацији са резултатима редукујуће моћи (Слика 7.4б). Међутим, ова корелација је незнатно нарушена када су у питању термички претретирани протеини беланцета хидролизоване једноступеним поступцима. Интересантно је да хидролизати добијени двоступеним поступцима не показују значајне разлике у погледу примењених претретмана протеина беланцета, али и да постоје незнатна одступања од корелације редукујуће моћи са степеном неутралисања DPPH радикала. Конкретно, највишу апсорпциону вредност редукујуће моћи дала је ензимска хидролиза изведена комбиновањем флеворзима и алкалазе, при чему је остварен степен хидролизе пептидних веза износио  $32,12 \pm 0,688\%$ . Јасно се види да хидролизати припремљени неутразом, са најнижим степенима хидролизе дају најмање редукујуће моћи и најнижи степен неутралисања радикала, што се управо приписује малом уделу изолованих олигопептида, носиоцима антиоксидативне активности, а знатно већем уделу полипептида. Дискутовани резултати потпуно су у сагласности са литературним подацима према којима је хидролизат протеина уљане репице,<sup>255</sup> хидролизат протеина пшеничних

клица,<sup>254</sup> припремљени алкалазом показују одличну редукујућу моћ и високе вредности антиоксидативних активности. Неке студије указују да постоји јака корелација између антиоксидативне активности и редукујуће моћи, нарочито када су у питању протеински хидролизати и њихове пептидне фракције и да висока редукујућа моћ биоактивних пептида указује на способност донирања електрона који може учествовати у реакцији са слободним радикалима и тако утицати на сузбијање ланчане радикалске реакције.<sup>256-258</sup> Такав је случај и са истраживањима која су се бавила испитивањем антиоксидативне активности протеинских хидролизата леблебије<sup>259</sup> и оброка<sup>g</sup> кукурузног глутена<sup>260</sup> применом различитих *in vitro* тестова.

Може се констатовати да је резултат ове фазе истраживања додатни показатељ да хидролизат алкалазе има значајну способност донирања електрона, а на тај начин и значај потенцијал антиоксидативне активности. Такође, ултразвучни претретман протеина беланцета значајно утиче на унапређење антиоксидативне активности произведених биоактивних пептида. С обзиром да су вредности степена неутралисања за оба испитана претретмана биле мање од 50%, у наредним фазама истраживања посебна пажња биће посвећена антиоксидативним тестовима и утврђивањем начина и механизма реаговања пептида из протеинских хидролизата беланцета са слободним радикалима. Такође, на основу ових прелиминарних резултата и сагледавањем вредности остварених брзина ензимске реакције, степена хидролизе и антиоксидативне активности, једностепена хидролиза беланцета у шаржном рекатору са мешањем катализована алкалазом, и двостепена ензимска хидролиза катализована алкалазом и флеворзимом, усвојене су као најефикасније, те су у даљем експерименталном раду управо оне.

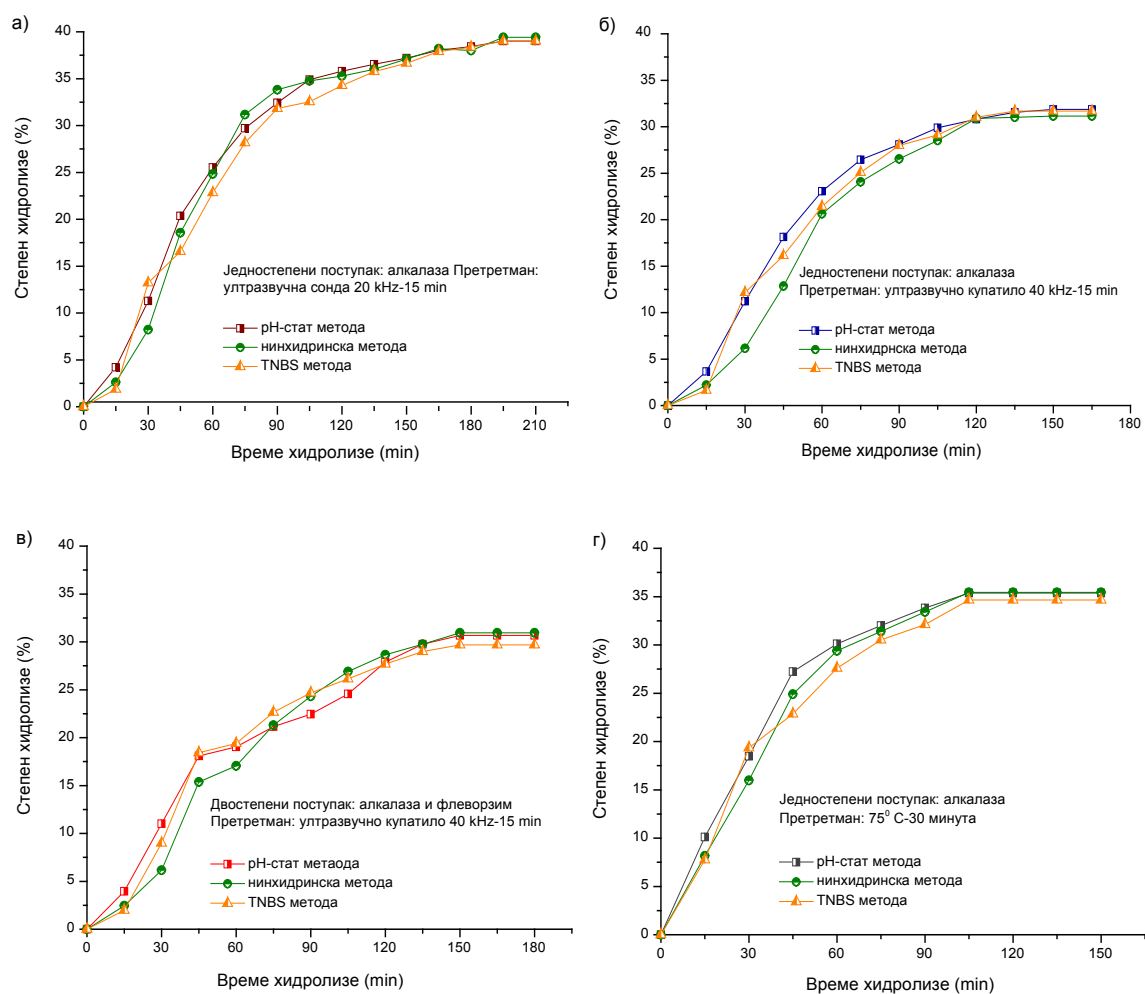
#### 7.1.3.1. рН-стат метода наспрам техника без одржавања константне рН у ензимској хидролизи протеина беланцета

На крају прве фазе истраживања, посебна пажња посвећена је поређењу степена хидролизе протеина беланцета и испитивању утицаја додатка базе током извођења хидролизе рН-стат методом. Да би се добијени резултати степена хидролизе рН-стат методом верификовали, од самог почетка научног истраживања упоредо са извођењем експеримената рН-стат методом вођени су и експерименти у

---

<sup>g</sup> Оброк кукурузног глутена је нерастворна протеинска фракција добијена из процеса сепарације кукурузног скроба из кукуруза.

којима је степен хидролизе праћен спектрофотометријским методама, нинхидринском методом и методом са TNBS киселином објашњеним у поглављима 6.3.5.2 и 6.3.5.3, редом. За серије експеримената ензимских хидролизата које су се из прелиминарних резултата (поглавља 7.1.1, 7.1.2 и 7.1.3) показале као најзначајније за даљи ток истраживања са аспеката антиоксидативне активности, оствареног степена хидролизе и адекватног оптимизованог ултразвучног претретмана, резултати остварених степена хидролизе рН-стат методом наспрам техника без одржавања рН графички су приказани на Слици 7.5.



**Слика 7.5.** Вредности остварених степена хидролизе одређених рН-стат методом наспрам техника без одржавања константне рН и упоредни приказ тока ензимске хидролизе протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz-15 минута (а), у ултразвучном купатилу фреквенце  $40 \pm 2$  kHz-15 минута изводећи једностепени (б) и двостепени (в) поступак, и високом температуром (г).

Тренд вредности степена хидролизе добијених рН-стат методом у сагласности је са оним вредностима добијених без одржавања константне рН, како нинхидринском методом тако и методом са TNBS киселином (Слика 7.5). Конкретно, статистички значајне разлике постигнутих равнотежних степена хидролизе нису уочљиве ( $p > 0,05$ ), али се контролом рН током ензимске хидролизе протеина беланцета и неконтролисањем исте уочавају знатне разлике у почетним брзинама реакције. Вођењем хидролизе без контроле рН, у току првих 60 минута запажа се смањење почетне брзине реакције како за једностепене поступке тако и за двостепене, што је и било очекивано с обзиром да на самом почетку након додавања ензима, због велике специфичности и афинитета према протеинима беланцета, долази до раскидања, тј. хидролизовања великог броја пептидних веза и знатног снижења рН вредности реакционе смеше. Хидролизати протеина сурутке, сагласно резултатима са Сlike 7.5, имају сличне степене хидролизе без обзира да ли су припремљени константним додавањем базе или не.<sup>261</sup> Резултати са Сlike 7.5 у сагласности су са литературним подацима<sup>90</sup> према којима почетна брзина реакције хидролизе протеина сурутке зависи од начина извођења хидролизе, тј. константног додавања базе или недодавања, али су у супротности са аспекта остваривања равнотежних степена хидролизе. Датаљније, хидролизом протеина сурутке и праћењем степена хидролизе методом са TNBS киселином остварени су већи степени хидролизе у поређењу са рН-стат методом, али су аутори том приликом уочили различито деловање NaOH и KOH, база које су се користиле за одржавање константне рН, у корист KOH. Исти аутори истичу да су јони калијума деловали као кофактори и/или активатори субтилизина–серинске протеазе и термолизина–неутралне метало-пептидазе из протамекса.<sup>90</sup> Друга група аутора известила је о позитивном деловању молекула соли на протеолитичку активност термолизина изолованог из *Bacillus thermoproteolyticus*,<sup>262</sup> док резултати овог истраживања (Слика 7.5) поуздано указују да присуство натијумове соли није довело до много већег побољшања активности алкалазе (серинске протеазе, субтилизина). У проточном ензимском мембранском реактору степен хидролизе изолата протеина сурутке поузданије је одређен методом са TNBS киселином у поређењу са рН-стат методом, код које је додавање базе довело до лажне слике о високом степену хидролизе који није потврђен анализом расподеле величина молекула и слободних аминокиселина.<sup>91</sup>



Студија о утицају рН вредности током ензимске хидролизе показала је да рН-контролисани и рН-неконтролисани услови хидролизе и те како утичу на ослобађање пептида, а последично и на биоактивна својства хидролизата протеина сурутке. Статистички значајно веће вредност јединице апсорпције кисеоничних радикала—ORAC јединице, добијене су за хидролизат сурутке припремљен папином при константном одржавању рН 7 током читавог процеса хидролизе у поређењу са хидролизатом сурутке код којег током дигестије папином није контролина рН, иако су остварени идентични равнотежни степени хидролизе. Супротно, значајан утицај регулације рН током хидролизе није уочен тестирањем хидролизата на инхибиторну активност дипептидил-пептидазе IV и аутори истичу да је потребно за различите протеолитичке ензиме и различите биолошке активности засебно установити и испитати утицај одржавања константне рН током хидролизе, као и тачну улогу рН на специфичност ензима и кинетику реакције заједно са потенцијалним утицајем на конформацију супстрата.<sup>261</sup>

Сходно томе, пажљиво је размотрена примена контролисана рН насупрот неконтролисана током ензимске хидролизе ултразвучно претретираних протеина беланцета и показано је да у случају једноступеног поступка алкалазом нису забележене значајне ( $p > 0,05$ ) промене степена неутралисања DPPH радикала и редукујуће моћи међу добијеним хидролизатима (*резултати нису приказани*). Зато је у даљим истраживањима настављена ензимска хидролиза вођена рН-стат методом, али како би се уклонили молекули соли из крајњих протеинских хидролизата и тиме олакшале наредне фазе пречишћавања и изоловања пептидних фракција, након декантовања хидролизата вршиће се одсољавање дијализом. Пошто је основи циљ хидролизе протеина беланцета у овом научном истраживању ослобађање биолошки активних пептида, према досадашњим резултатима закључује се да би било веома интересантно користити биоактивност хидролизата као главни параметар који би диктирао тачку заустављања реакције хидролизе. Литературни подаци наводе да се наведено може остварити познавањем кинетике ослобађања биоактивних пептида што зависи и од реакционих услова, рН и температуре.<sup>263</sup>

## **7.2. КИНЕТИЧКА СТУДИЈА ЕНЗИМСКЕ ХИДРОЛИЗЕ ПРОТЕИНА БЕЛАНЦЕТА**

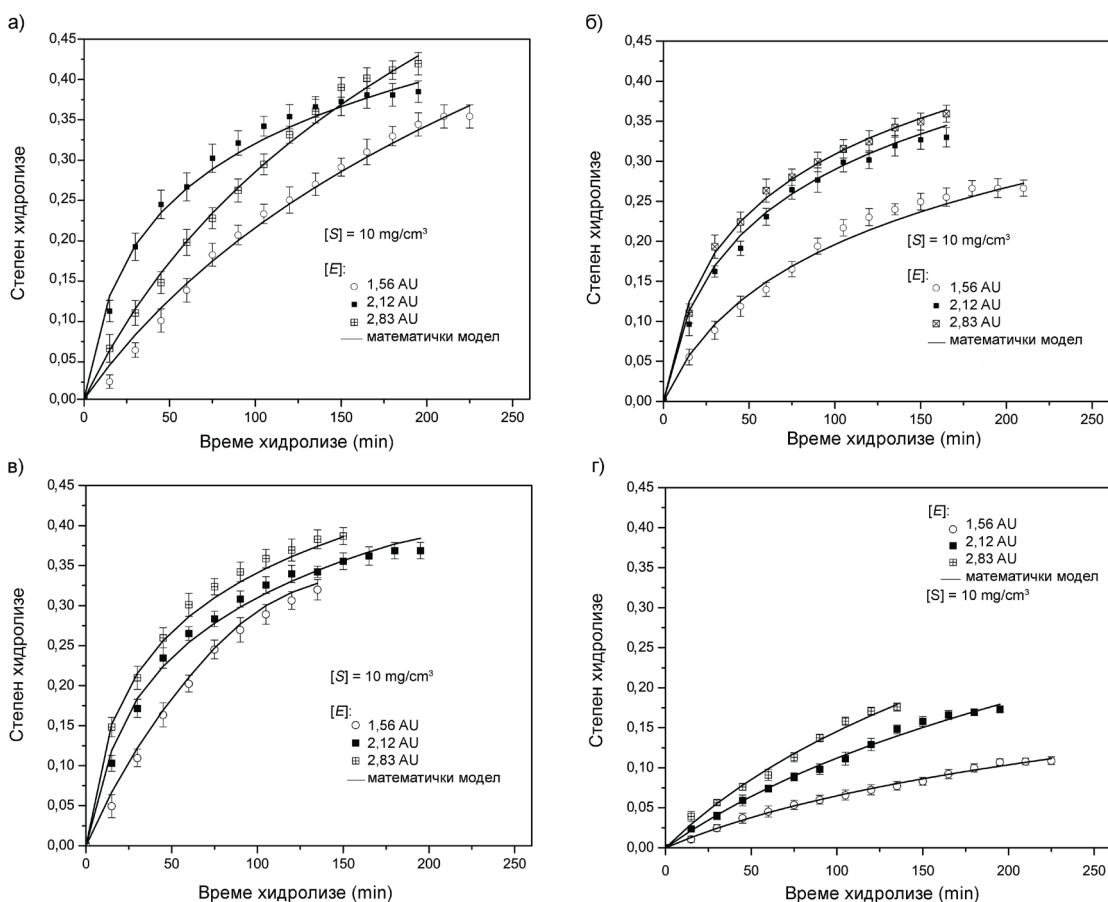
Кинетика ензимске хидролизе протеина, генерално, бави се утицајем различитих процесних фактора као што су: почетне концентрације ензима и супстрата, рН и температура на брзину ензимске реакције, тако да је основни циљ ове кинетичке студије одређивање закона брзине ензимске реакције помоћу кога се може израчунати време одигравања и принос реакције хидролизе протеина беланцета под одређеним условима. Наведено представља полазну теоријску основу за добијање пројектних једначина неопходних приликом пројектовања ензимских реактора и оптимизације ензимских процеса хидролизе протеина.

Претходно дискутовани резултати пододељка 7.1.3 показују да хидролизати ултразвучно претретираних протеина беланцета припремљени алкалазом имају већу антиоксидативну активност, али брзине реакције су значајно мање у поређењу са термички претретираним беланцетом. Са аспекта индустријске примене ултразвучног претретмана и ензимске хидролизе, а у сврху производње нутритивно вредних протеинских хидролизата, неопходно је остварити задовољавајућу брзину реакције што изискује кинетичку анализу и различит режим третирања протеина беланцета ултразвуком како би се постигла што већа денатурација протеина и на тај начин већи степен хидролизе, а смањиле контаминација производа током дужег трајања процеса и запремина биореактора. Због тога, ова фаза истраживања посвећена је кинетичкој студији протеина беланцета претретираних ултразвуком  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz, примењујући различите ултразвучне уређаје.

### **7.2.1. Утицај процесних параметара на кинетику једноступеног поступка хидролизе протеина беланцета**

Иако је ензимска хидролиза протеина беланцета комплексан процес због специфичности деловања алкалазе, разноликости супстрата који је укључен у реакциони механизам због претретмана, у овом истраживању је за описивање кинетике коришћен математички модел који доводи до поуздане интерполације експерименталних података. Наиме, добијени експериментални резултати моделовани су кинетичким моделом чија је емпиријска једначина експоненцијална функција  $dx/dt = a \cdot \exp(-bx)$ , а реакциони механизам детаљно је описан у потпоглављу 4.3. Реч је о полу-емпиријском кинетичком моделу који узима у обзир дезактивацију

ензима и инхибицију супстратом у вишку, по коме је реакција хидролизе реакција другог реда, а валидност предложеног модела испитана је праћењем почетне кинетике. Почетна кинетика хидролизе испитана је праћењем утицаја процесних параметара: почетне концентрације ензима (1,56; 2,12 и 2,83 AU) и почетне концентрације супстрата (5; 7,5; 10 и 20 mg/cm<sup>3</sup>, садржај протеина одређен стандардном методом по Кјелдалу,  $N \times 6,25$ ;  $E/S$  однос вариран у опсегу 0,29-1,18 AU/g протеина), у једноступеном поступку при оптималним реакционим условима за дејство алкалазе. Експерименталне криве зависности степена хидролизе пептидних веза израженог само као однос пептидних веза хидролизованых у тренутку  $t$  и укупаног број пептидних веза у протеинском супстрату, беланцету, од времена приказане су на Сликама 7.6 и 7.7.



**Слика 7.6.** Утицај почетне концентрације ензима и начина извођења ултразвучног претретмана на степен хидролизе и брзину реакције једноступеног поступка хидролизе протеина беланцета алкалазом у шаржном реактору са механичким мешањем: а) ултразвучна сонда фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz–15 минута, б) ултразвучно купатило фреквенце  $40 \pm 2$  kHz–15 минута, в) претретман високом температуром и г) контролни поступак хидролизе–без претретмана.

Јасно се уочава да са временом долази до знатног повећања брзине реакције хидролизе протеина, да степен хидролизе тежи граничној равнотежној вредности, повећавајући се са порастом почетне концентрације ензима. Приметно је да су код оба ултразвучна претретмана протеина, али и термичког претретмана, најнижи степени хидролизе протеина беланцета остварени са најмањом почетном концентрацијом алкалазе од 1,56 AU. Исти тренд уочава се и код контролног узорка, тј. хидролизата припремљеног без претретмана протеина. Евидентно је да у случају када је доступна довољна концентрација супстрата повећање почетне концентрације ензима проузрокује повећање почетне брзине реакције ензимске хидролизе протеина беланцета. Међутим, очигледна је мала разлика у почетним брзинама и крајњим степенима хидролизе међу концентрацијама ензима 2,12 и 2,83 AU, у случају оба ултразвучна претретмана што указује на чињеницу да је при високим концентрацијама ензима дошло до стерних сметњи и отежане адсорпције молекула ензима услед смањења броја доступних везујућих места на молекулима супстрата, тј. протеина беланцета, а последично и до смањене ефикасности ензимске хидролизе. Експериментални резултати почетне кинетике ензимске хидролизе протеина беланцета показују добро слагање са кинетичким моделом који узима у обзир дезактивацију ензима и инхибицију супстратом у вишку, по коме је реакција хидролизе реакција другог реда, и у сагласности су са литературним резултатима кинетичких студија о ензимској хидролизе нативних и ултразвучно претретаних протеина беланцета,<sup>221</sup> сурутке,<sup>131</sup> кукурузног глутена,<sup>264-265</sup> овсеног протеинског изолата,<sup>266</sup> рибљих протеина<sup>267</sup> и пшеничних клица.<sup>134, 268</sup>

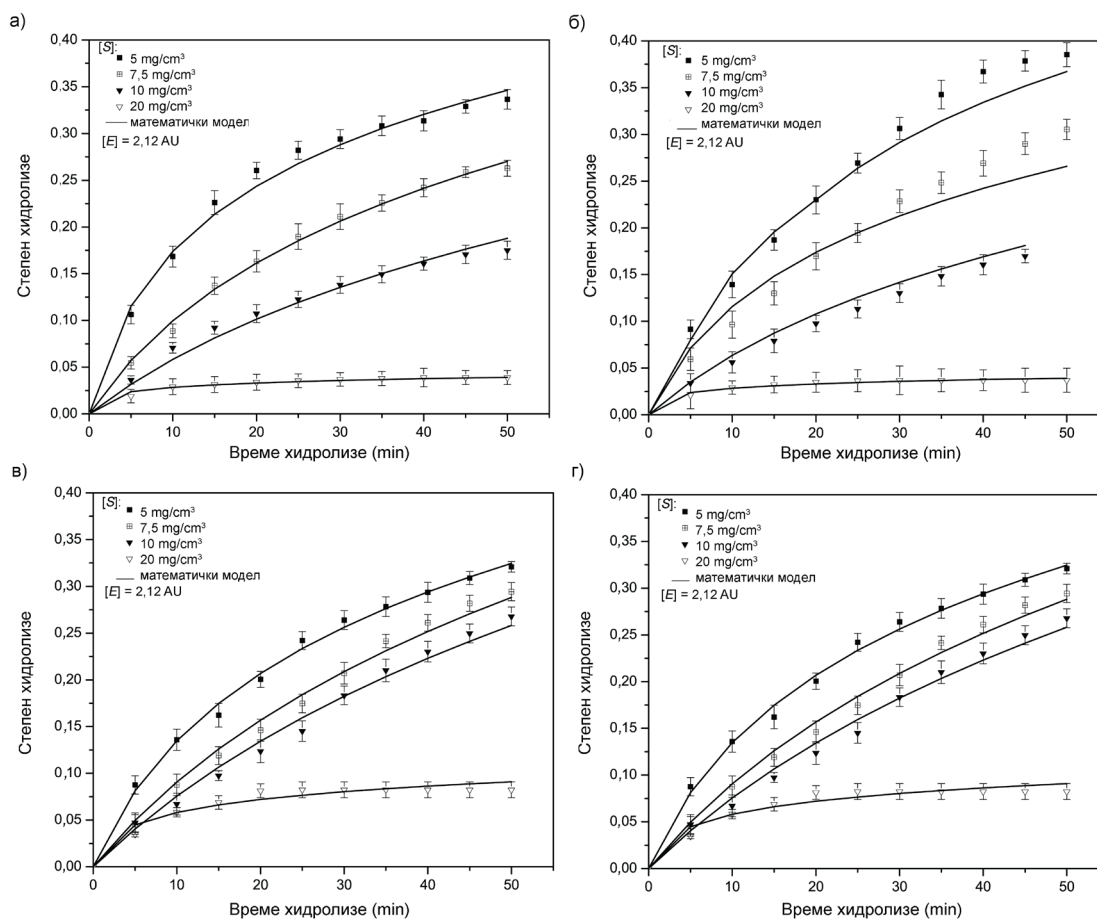
Са друге стране, разматрајући утицај претретмана на промену почетне брзине и ток ензимске хидролизе, претретман ултразвучном сондом фреквенце 20 kHz показао се као значајно ( $p < 0,05$ ) ефикаснији у поређењу са претретманом изведеним у ултразвучном купатилу и термичким претретманом, очигледно позитивно утичући на ензимску активност и на тај начин омогућујући постизање већих степена хидролизе при нижим концентрацијама ензима. Резултати са Сlike 7.6а указују да је већа почетна брзина реакције постигнута при концентрацији 2,12 AU у односу на 2,83 AU, али и да при вишим концентрацијама ензима од 1,56 AU долази до релативно општрог повећања степена хидролизе током првих 50 минута реакције. Наведени тренд нарочито је очигледан за хидролизу изведену при концентрацији алкалазе 2,12 AU, код које је у току првих 50 минута прореаговало мање од 20%

почетне концентрације протеина беланцета. Могуће је претпоставити да је забележено повећање почетне брзине реакције хидролизе протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом последица ефективног деловања кавитације индуковане сондом. Овакав утицај може се објаснити чињеницом да кавитација узрокује структурне промене протеина, доводећи до одмотавања молекула протеина беланцета што је корисно за напад алкалазе, јер се олакшава доступност супстрата ензиму, смањују се дифузионе лимитације током формирања ензим-супстрат комплекса, а резултира повећањем брзине реакције хидролизе. Позитивно деловање кавитације на структурне промене протеина, а самим тим и на повећање брзине реакције и степен хидролизе у сагласности је са резултатима других кинетичких студија.<sup>134, 164, 269-271</sup> Група аутора претпоставља да су механички, топлотни и хемијски ефекти ултрасоникације довели до структурних промена пречишћеног говећег серума албумина које су приписали формирању ултразвучно-индукованог (побуђеног) стања молекула протеина које се разликује од других индукованих стања молекула.<sup>272</sup>

Прегледом доступних литературних резултата уочљиво је да концентрација супстрата има важну улогу у дезактивацији ензима, да концентрација хидролизованых пептидних веза није фактор који контролише степен хидролизе и да је инхибиција супстратом веома честа појава у ензимским реакцијама хидролизе протеина. Узимајући наведено у обзир, утицај почетне концентрације супстрата на брзину реакције и степен хидролизе протеина беланцета претретираних ултразвучним таласима испитан је, а добијени резултати експерименталних криви хидролизе моделовани су кинетичким моделом и графички представљени на Слици 7.7. Експерименти су изведени у шаржном рекатору са механичким мешањем, запремине  $600 \text{ cm}^3$ , варирањем концентрације супстрата (5; 7,5; 10 и  $20 \text{ mg/cm}^3$ ) у једноступеном ензимском поступку са алкалазом при оптималним реакционим уловима и претходно усвојеној концентрацији алкалазе 2,12 AU, као и усвојеном времену одигравања почетне кинетике (првих 50 минута).

Евидентно је да повећање концентрације протеина беланцета узрокује значајно ( $p < 0,05$ ) смањење степена хидролизе и брзине реакције како контролних узорака без и са термичким третманом тако и ултразвучно претретираних узорака, као и то да се највећи степен хидролизе остварује при најнижој концентрацији протеина од  $5 \text{ mg/cm}^3$ . Поред наведеног, број еквивалената хидролизованых пептидних веза у времену смањује се повећањем концентрације супстрата (*резултати нису приказани*) што

указује да током хидролизе протеина беланцета долази до инхибиције ензима супстратом. Забележена инхибиција не сме се занемарити и претпоставља се да управо неактивни комплекс ензима са супстратом (супстрат-ензим-супстрат) и прекомерна количина супстрата спречавају настајање производа реакције хидролизе. С обзиром да се у овом истраживању као супстрат користе протеини, никако се не сме занемарити и присуство производа реакције—олигопептида који интензивно учеству у надметању са молекулима нехидролизованог супстрата.



**Слика 7.7.** Утицај почетне концентрације супстрата и начина извођења ултразвучног претретмана на степен хидролизе и брзину реакције једноступеног поступка хидролизе протеина беланцета алкалазом у шаржном реактору са механичким мешањем: а) ултразвучна сонда фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz–15 минута, б) ултразвучно купатило фреквенце  $40 \pm 2$  kHz–15 минута, в) претретман високом температуром и г) контролни поступак хидролизе—без претретмана.

Реакција између ензима и олигопептида (инхибитора) одиграва се без настанка нових мањих пептида, па је допринос ове реакције укупној брзини реакције хидролизе еквивалентан нули, а због утрошка значајне количине молекула ензима

смањење укупне брзине реакције је значајно.<sup>266</sup> Слично ензимским процесима хидролизе других протеина,<sup>131</sup> опадање брзине реакције и степена хидролизе са повећањем концентрације супстрата које је очигледно за експерименталне криве са Сликe 7.7 може се приписати једном од следећих фактора: 1) смањењу концентрације пептидних веза доступних за хидролизу, 2) инхибицији супстратом и/или производима реакције и 3) дезактивацији ензима. Додавањем нове количине супстрата у реакциони систем после 90 минута ензимске хидролизе није уочено значајно повећање степена хидролизе (*резултати нису приказани*) што је била потврда да концентрација доступних пептидних веза није била лимитирајући фактор почетне брзине реакције хидролизе и да се смањење брзине реакције може приписати само инхибицији ензима. Како би се наведено потврдило, у реакциони систем је додата нова количина алкалазе и забележено је изразито повећање степена хидролизе и брзине реакције (*резултати нису приказани*) што је била поуздана тврдња да је током хидролизе ултразвучно претретираних и нетретираних протеина беланцета дошло до дезактивације ензима.<sup>h</sup>

Аутори истичу да постоји неколико фактора који доводе до дезактивације ензима и због којих је неопходна већа количина ензима како би се успешно катализовала реакција хидролизе. Конкретно, истраживачи су показали да висока температура, смицајне силе и одигравање реакције хидролизе на граничној површини гас-течно представљају основне факторе који доводе до дезактивације ензима.<sup>133, 273-274</sup> С друге стране, Мохамед Ахмед (Mohamed Ahmed) и сарадници су потврдили да аутокатализа ензима негативно утиче на активност ензима и да зависи од почетне концентрације ензима, температуре и рН.<sup>275</sup> На основу примарних резултата кинетичке студије са Слика 7.6 и 7.7, генерално, запажа се добра сагласност експерименталних резултата и предвиђених теоријских вредности ( $p < 0,05$ ), што указује на то да се инхерентна кинетика хидролизе ултразвучно претретираних протеина беланцета поуздано може описати полу-емпиријским кинетичким моделом који узима у обзир инхибицију супстратом нултог реда и дезактивацију ензима другог реда (једначине (4.14) и (4.15)), због чега се овај модел може сматрати ефикасним за оптимизацију и поређење процеса хидролизе протеина беланцета.

---

<sup>h</sup> Такође, протеолитичка активност алкалазе је праћена током времена реакције хидролизе, и забележена инактивација (инхибиција) ензима је потврђена.

#### 7.2.1.1. Утицај ултразвучног претретмана на вредности кинетичких параметара и кинетичких константи

Чини се јасно да кинетички параметри  $a$  и  $b$  који фигуришу у експоненцијалној једначини математичког модела, зависе од врсте претретмана протеина и основних процесних параметара хидролизе као што су почетна концентрација ензима, почетна концентрација супстрата и температура. Следствено, заједно са спровођењем анализа почетне кинетике, кинетички параметри  $a$  и  $b$  су испитани непосредно пре утврђивања брзине реакција ензимске хидролизе протеина беланцета, док су вредности израчунате нелинеарном регресионом анализом (Табела 7.1). Вредности параметара  $a$  и  $b$  искоришћене су за квантитативно поређивање ефикасности ултразвучних претретмана са контролним узорцима, али и за одређивање доступности супстрата ензимској хидролизи. Одређене вредности кинетичких параметара значајно се ( $p < 0,05$ ) разликују у зависности од врсте и начина извођења претретмана протеина беланцета, а очигледан је јасан тренд са променама концентрације ензима и супстрата. Повећање почетне концентрације ензима доводи до повећања вредности параметра  $a$  и обрнуто, повећање концентрације супстрата доводи до смањења вредности параметра  $a$  (Табела 7.1).

Као што је илустровано на графицима са Слика 7.6 и 7.7, повећањем почетне концентрације ензима и смањењем почетне концентрације супстрата повећава се брзина реакције ензимске хидролизе и наведена зависност је у сагласности са наведеном променом вредности параметра  $a$  у функцији концентрације ензима и супстрата. На исти начин, запажа се да параметар  $b$  искључиво зависи од концентрације супстрата, да повећањем концентрације ензима се не постиже значајна промена ( $p > 0,05$ ), али да се повећањем концентрације супстрата вредности параметра  $b$  смањују како за хидролизате припремљене хидролизом ултразвучно претретраних протеина беланцета, тако и термички претретраних. С друге стране, кинетички параметар  $b$  је за разлику од параметра  $a$  окарактерисан као стабилнији, јер на његове вредности значајно мање, скоро уопште, не утичу промене реакционих услова укључујући почетну концентрацију ензима и температуру. Литературни подаци о вредностима кинетичких параметара добијених у току ензимског поступка хидролизе глобуларних и фибриларних, тј. кончастих протеина у потпуности се слажу са резултатима изнетим у овом потпоглављу.<sup>131-132, 267</sup>



**Табела 7.1.** Вредности кинетичких параметара  $a$  и  $b$  у студији ензимске хидролизе претретираних протеина беланцета при различитим процесним параметрима.

$s_o$ (mg/cm <sup>3</sup> )	$e_o$ (AU)	Т (°C)	$a$ (min <sup>-1</sup> )				$b$				
			К	УС-20 kHz	ВТ	УК-40 kHz	К	УС-20 kHz	ВТ	УК-40 kHz	
5	2,12	50	0,0086	0,0330	0,0250	0,0560	8,237	8,009	4,558	8,733	
7,5			0,0068	0,0150	0,0190	0,0210	7,794	7,265	4,080	8,137	
20			0,0013	0,0023	0,0025	0,0022	6,562	6,425	3,491	7,022	
10	1,56	50	0,0012	0,0068	0,0014	0,0057	8,271	8,733	8,237	8,271	
				0,0015	0,0097	0,0019	0,0086	8,256	8,285	8,065	8,396
				0,0021	0,0150	0,0015	0,0120	8,926	8,267	8,659	8,361
10	2,12	45	0,0006	0,0093	0,0009	0,0064	7,160	7,028	4,539	6,902	
		55	0,0024	0,0150	0,0033	0,0110	7,577	6,997	4,590	6,900	
		65	0,0046	0,0180	0,0049	0,0160	7,388	7,013	4,838	6,763	

*Легенда:* УС-20 kHz – ултразвучна сонда фреквенце 20±0,2 kHz -15 минута, УС-40 kHz – ултразвучно купатило фреквенце 40±2 kHz-15 минута, ВТ- висока температура – 75 °C-30 минута, К-контрола – без третмана.

**Табела 7.2.** Вредности кинетичких константи  $k_2$ ,  $K_I$  и  $k_d$  у студији ензимске хидролизе различито претретираних протеина беланцета.

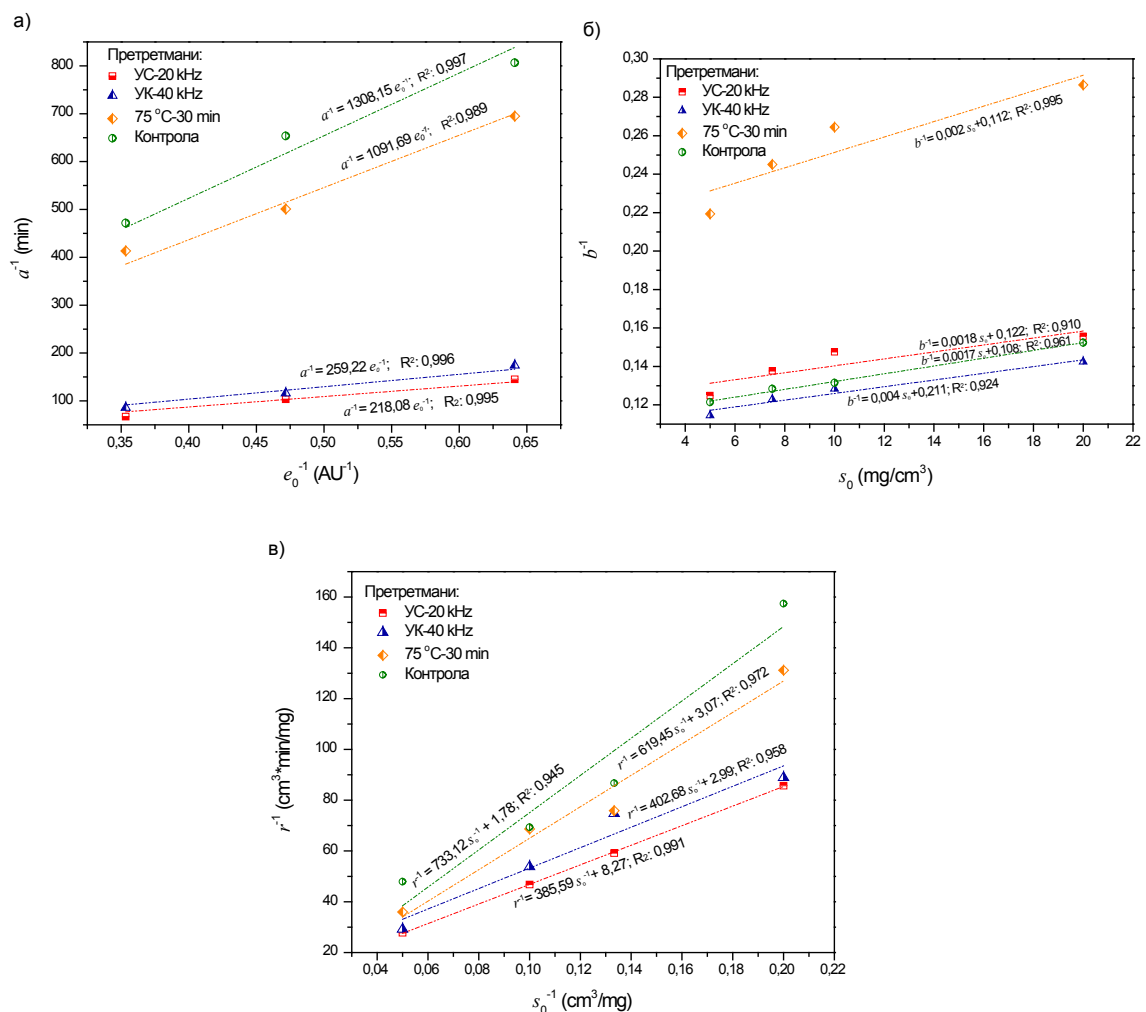
Претретман	$k_2$ (min <sup>-1</sup> )	$K_I$ (mg/cm <sup>3</sup> )	$k_d$ (min <sup>-1</sup> )
Без претретмана	0,009±0,001	55,9±2,5	0,08±0,02
Ултразвучна сонда 20 kHz	0,053±0,002	67,9±2,7	0,45±0,01
Ултразвучно купатило 40 kHz	0,045±0,001	63,8±3,2	0,41±0,02
Висока температура	0,011±0,003	52,8±6,4	0,05±0,05

Зависност кинетичких параметара  $a$  и  $b$  од почетних концентрација ензима и супстрата, редом, послужила је за одређивање вредности кинетичких константи приказаних у Табели 7.2 користећи методу линеарне регресије. Детаљније, конструисањем прави зависности  $a^{-1} \sim e_0^{-1}$ ,  $b^{-1} \sim s_0$  и  $r^{-1} \sim s_0^{-1}$  (Слика 7.8) и одређивањем одговарајућих нагиба и одсецака, а затим комбиновањем са једначинама (4.16) и (4.17) из потпоглавља 4.3 израчунате су вредности кинетичких константи  $k_2$  ( $\text{min}^{-1}$ ),  $K_1$  ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) и  $k_d$  ( $\text{min}^{-1}$ ).

Поређењем израчунатих вредности константи брзине реакције,  $k_2$  које могу да послуже као квантитативна мера брзина ензимске реакције, евидентно је да претретман протеина беланцета изведен ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz, при усвојеном времену третирања 15 минута, доводи до повећања брзине реакције у односу на остале претретмане, нарочито хидролизу нативних протеина без третмана (контрола). Овим претретманом реакција хидролизе се одиграла готово 4,8 и 5,8 пута брже у поређењу са хидролизом термички претретираних протеина и контролном хидролизом, редом. Међутим, од велике је важности истаћи да 4,8 пута већа константа брзине утицала је незнатно на свеукупни степен хидролизе, тако да је остварен равнотежни степен хидролизе био већи за свега 3,5%. Ово повећање степена хидролизе у просеку од 3,5% је конзистентно са резултатима истраживача који су запазили слично побољшање хидролизе церебралних протеина.<sup>276</sup> Повећање брзине хидролизе и степена хидролизе применом ултразвучног претретмана у складу је са литературним подацима према којима је након ултразвучног претретмана (фреквенце 40 kHz, снаге 294 W, време третирања 15 минута на 35 °C) желатина и накнадне хидролизе колагеназом брзина реакције повећана за 27,5%.<sup>269</sup> Група аутора је утврдила да је константа брзине ензимске хидролизе ултразвучно третираног казеина, изведена алкалазом, побољшана за 12,5-62,7% у зависности од температуре.<sup>277</sup>

Посматрањем вредности константе инхибиције,  $K_i$ , и константе брзине дезактивације ензима,  $k_d$ , види се да изузетно варирају у зависности од примењеног претретмана и да се крећу у опсегу од  $52,8 \pm 6,4$   $\text{mg}/\text{cm}^3$  и  $0,05 \pm 0,05$   $\text{min}^{-1}$  за серије експеримената са третманом високом температуром до  $67,9 \pm 2,7$   $\text{mg}/\text{cm}^3$  и  $0,45 \pm 0,01$   $\text{min}^{-1}$  за серије експеримената са соницирањем ултразвучном сондом, редом. То је вероватно последица претретмана ултразвучним таласима који је узорковао структурне промене молекула протеина беланцета повећавајући тако доступност пептидних веза

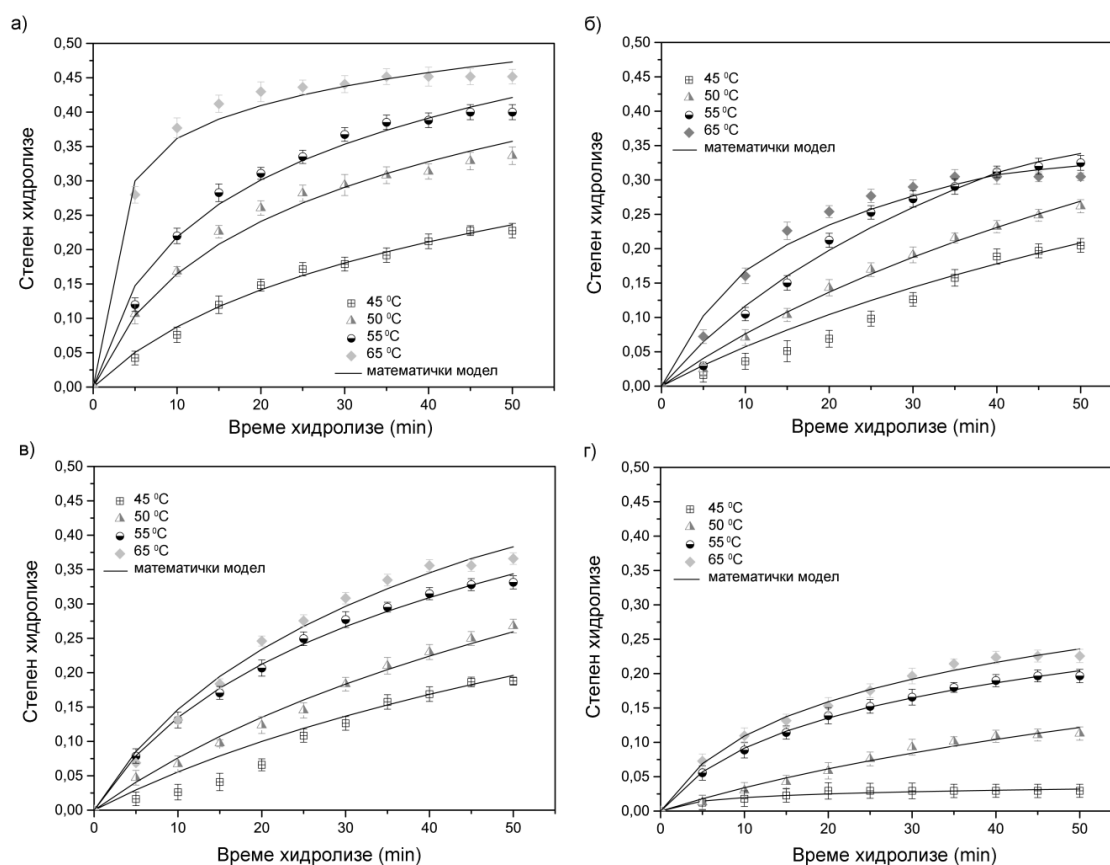
за хидролизу алкалазом, што може утицати како на инхибицију ензима супстратом, тако и на стабилности ензима. Наиме, вредност константе инхибиције контролне ензимске реакције је нижа од вредности добијених за реакције хидролизе сонцираних узорака, што сугерише на чињеницу да ултразвучни претретман смањује инхибицију ензима супстратом. Тумачењем резултата ове кинетичке анализе сумарно се може рећи да смањење инхибиције ензима супстратом, као и повећање активности ензима и брзине реакције указују на побољшање ензимске хидролизе након оба ултразвучна претретмана, чиме је и квантитативно доказан позитиван ефекат ултразвучних претретмана.



**Слика 7.8.** Графички приказ зависности кинетичких параметара и почетне брзине реакције у функцији почетне концентрације ензима и супстрата: (а) зависност  $a^{-1}$  и  $e_0^{-1}$ , (б) зависност  $b^{-1} \sim s_0$  и (в) зависност  $r^{-1} \sim s_0^{-1}$ . *Легенда:* UC-20 kHz – ултразвучна сонда фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz - 15 минута, UC-40 kHz – ултразвучно купатило фреквенце  $40 \pm 2$  kHz-15 минута, 75 °C-30 min – висока температура, контрола – без претретмана.

7.2.1.2. Утицај ултразвучног претретмана на термодинамичку анализу ензимске хидролизе протеина беланцета

Како би се утврдио утицај температуре на брзину ензимске реакције хидролизе и активност ензима изведене су серије истих експеримената при усвојеним почетним концентрацијам ензима 2,12 AU и супстрата 10 mg/cm<sup>3</sup>, усвојеном времену одигравања почетне кинетике (првих 50 минута) на четири различите температуре (45, 50, 55 и 65 °C). Експерименталне криве зависности степена хидролизе пептидних веза израженог као однос пептидних веза хидролизованых у тренутку  $t$  и укупног броја пептидних веза у протеинском супстрату беланцету од времена графички су приказане на Слици 7.9. Експериментални резултати моделовани су усвојеним полу-емпиријским кинетичким моделом, вредности кинетичких параметара  $a$  и  $b$  су израчунате и представљене у Табели 7.1.



**Слика 7.9.** Утицај температуре реакције хидролизе и начина извођења ултразвучног претретмана на степен хидролизе и брзину реакције једноступеног поступка хидролизе протеина беланцета алкалазом: а) ултразвучна сонда фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz–15 минута, б) ултразвучно купатило фреквенце  $40 \pm 2$  kHz–15 минута, в) претретман високом температуром и г) контролни поступак хидролизе–без претретмана ( $[E] = 2,12$  AU,  $[S] = 10$  mg/cm<sup>3</sup>).

Очигледно је да реакције хидролизе изведене при високим температурама имају веће брзине реакције, без обзира на врсту ултразвучног претретмана протеина беланцета. Претпоставља се да високе температуре доводе до знатног побољшања ензимске активности, али и фреквенце судара између молекула алкалазе и протеина беланцета, потпомажући хидролизу сложене структуре протеина беланцета, што резултира већом брзином реакције. О идентичној позитивној корелацији између активности ензима и температуре известили су Кју (Qu) и сарадници.<sup>134</sup> У поређењу са конвенционалном хидролизом без претретмана протеина беланцета, оба претретмана ултразвучним таласима генерисаним сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz и у купатилу фреквенце  $40 \pm 2$  kHz довела су до повећања брзине реакције хидролизе на 45, 50, 55 и 65 °C и то 2; 2,4; 2,5 и 5,7 пута, редом и 1,6; 2,4; 2,2 и 1,1 пута, редом. Приказани резултати указују на позитиван ефекат како ултразвучне сонде тако и ултразвучног купатила и њихов значајан допринос константи брзине реакције највише на нижим температурама, а нешто мање на вишим. Међутим, не треба заборавити да порастом температуре истовремено се убрзава и дезактивација ензима, што смањује брзину реакције. Интересантно је запажање да се степен хидролизе повећава повећањем температуре, али се упоредо брзина реакције брзо смањује на вишим температурама због денатурације ензима. Ово је најприметније код хидролизе протеина беланцета претретраних ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz (Слика 7.9а). У сагласности са приказаним резултатима, вредности константе брзине реакције хидролизе нетретраних и ултразвучно претретраних (ултразвучна сонда фреквенце 20 kHz) протеина сурутке повећале су се повећањем температуре.<sup>278</sup> Слично дискутованим резултатима, у поређењу са нетретраним, третирани узорак протеина сурутке имао је значајно већу вредност константе брзине услед промена секундарне структуре протеина индукованих соницирањем.<sup>277</sup>

О утицају температуре на брзину реакције може се дискутивати и посматрањем вредности кинетичких параметара  $a$  и  $b$  приказаних у Табели 7.1. Јасно је да се оба кинетичка параметра мењају са променом температуре, а ако се узме у обзир да параметар  $a$  има значајност константе брзине  $k_2$  онда је још једном потврђено да је при вишим температурама реакција бржа (у почетном времену) за све примењене претретмане. Промене параметара  $a$  и  $b$  изазване температуром могу се описати поменутом Аренијусовом једначином (4.19) и (4.20), а вредности енергије активације  $E_a$  и енергије дезактивације  $E_d$  резимиране у Табели 7.3 могу се израчунати методом

линеарне регресије цртањем зависности  $\ln a \sim 1/T$  и  $\ln (a \cdot b) \sim 1/T$  (Слика 7.10). Проучавањем различитих поступака ензимске хидролизе протеина хране утврђено је да се ултразвучним третманом енергија активације реакције хидролизе смањује за приближно 50%, као и да се принос пептида малих молекулских маса значајно побољшава.<sup>134, 269, 277</sup>

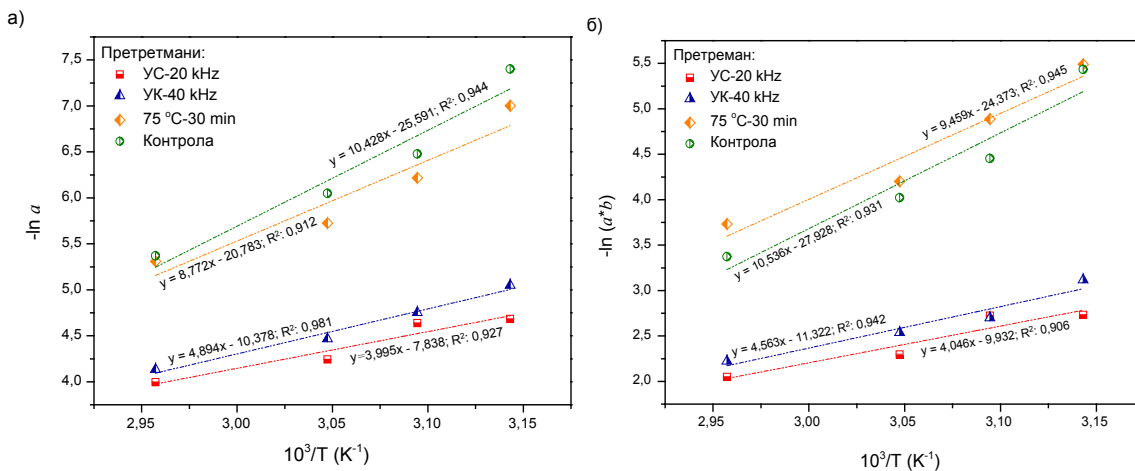
Вредности  $E_a$  за сваки хидролизат претретираних протеина беланцета ниже су него за контроли хидролизат нетретираних протеина беланцета и указују на чињеницу да је потребно значајно мање енергије да би се у овом случају постигла бржа реакција. Међу свим претретманима, реакција хидролизе протеина претретираних ултразвучном сондом одиграва се најбрже указујући на то да се овим претретманом значајно смањује енергетска баријера која је потребна за реакцију. Поред тога, остварено је изузетно смањење у односу на конвенционални термички претретман коме је, на основу израчунатих вредности, потребно чак 55% више енергије за превазилажење енергетске баријере. Интересантно је да су вредности енергије активације и дезактивације ензимске хидролизе протеина претретираних ултразвучном сондом сличне ( $E_a = 33,21 \text{ kJ/mol}$ ,  $E_d = 33,64 \text{ kJ/mol}$ ), што доводи до закључка да је за одигравање обе реакције потребно да се савладају сличне енергетске баријере ( $p > 0,05$ ). Међутим, значајна разлика ( $p < 0,05$ ) вредности  $E_a$  и  $E_d$  је добијена за ензимску хидролизу традиционално термички третираних узорка протеина беланцета ( $E_a = 72,93 \text{ kJ/mol}$ ,  $E_d = 78,64 \text{ kJ/mol}$ ). Овакво понашање међу испитаним претретманима може се објаснити различитим деловањем ултразвучних таласа и утицајем кавитације на сложене молекуле протеина беланцета. Заправо, под утицајем ефеката кавитације може чак доћи и до раскидања хемијских веза у молекулу протеина беланцета, као и до промена конформације протеина чиме пептидне везе бивају доступније молекулима алкалазе.

Промена енталпије ( $\Delta H$ ) и промена ентропије ( $\Delta S$ ) реакције хидролизе протеина беланцета за све испитане претретмане израчунате су коришћењем теорије прелазног стања, по којој молекули реактанта реакције пре него што прореагују чине активни комплекс.<sup>1</sup> Израчунате вредности промене енталпије и ентропије, као и

---

<sup>1</sup> Активни комплекс  $[ES]^*$  има конфигурацију атома која енергетски одговара врху енергетске баријере која раздваја реактанте од продуката реакције. Њему одговара мало растојање  $\delta$  дуж реакционе координате (реакционог пута) на врху енергетске баријере. Активни комплекс представља скуп атома за који се претпоставља да је сличан обичном молекулу, с том разликом што поседује једну карактеристичну вибрацију  $\nu$  у погледу које је нестабилан.

Гибсове ( $\Delta G$ ) слободне енергије реакције хидролизе протеина беланцета на свакој температури сумиране су у Табели 7.4 и очигледан је подударан тренд вредности као код енергије активације.



**Слика 7.10.** Графички приказ зависности кинетичких параметара и температуре реакције хидролизе претретираних протеина беланцета: а) зависност  $-\ln a \sim 10^3/T$  и б) зависност  $-\ln(a*b) \sim 10^3/T$ . *Легенда:* УС-20 kHz – ултразвучна сонда фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz -15 минута, УС-40 kHz – ултразвучно купатило фреквенце  $40 \pm 2$  kHz-15 минута, 75 °C-30 min – висока температура, контрола – без претретмана.

На основу приказаних вредности (Табела 7.4) могуће је утврдити да је хидролиза нетретираних и претретираних протеина беланцета ендотермна реакција, као и да промена енталпије ( $\Delta H$ ) има највећи утицај на промену слободне Гибсове енергије у опсегу температура од 318,15 К (45 °C) до 338,15 К (65 °C). Конкретно, са термодинамичког аспекта, одређена енергија за раскидање пептидних веза у молекулима протеина беланцета је неопходна, јер је свака вредност промене енталпије у Табели 7.4 већа од нуле. Очигледно је да се вредности промене ентропије ( $\Delta S$ ) повећавају са порастом температуре реакције хидролизе како за ултравучно претретираних, тако и за термички претретираних протеина беланцета, и да је након претретмана раствор протеина беланцета уређенији и ближи равнотежном стању. У односу на контролну ензимску хидролизу, најизраженије смањење  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  и  $\Delta G$  примећује се за ензимску хидролизу протеина беланцета претретираних ултравучном сондом фреквенце 20 kHz и оно износи 63,6%, 4,2% и 32,2%, редом.

Управо та вибрација доводи до дисоцијације активног комплекса на производе реакције. Такође, сматра се да је она еквивалентна транслаторном степеноу слободе који доводи до стварања производа реакције.<sup>279</sup>

**Табела 7.3.** Вредности енергије активације и енергије дезактивације у студији ензимске хидролизе различито претретираних протеина беланцета.

Претретман	$E_a$ (kJ/mol)	$E_d$ (kJ/mol)
<b>Без претретмана</b>	86,7±1,1	87,6±1,1
<b>Ултразвучна сонда 20 kHz</b>	33,2±0,8	33,6±0,8
<b>Ултразвучно купатило 40 kHz</b>	72,9±1,5	78,6±1,4
<b>Висока температура</b>	40,7±2,4	37,9±3,1

**Табела 7.4.** Вредности термодинамичких константи у студији ензимске хидролизе различито претретираних протеина беланцета.

Претретман	$\Delta H$ (kJ/mol)				$\Delta S$ (J/K mol)				$\Delta G$ (kJ/mol)			
	$\Delta H_{318}$	$\Delta H_{323}$	$\Delta H_{328}$	$\Delta H_{338}$	$\Delta S_{318}$	$\Delta S_{323}$	$\Delta S_{328}$	$\Delta S_{338}$	$\Delta G_{318}$	$\Delta G_{323}$	$\Delta G_{328}$	$\Delta G_{338}$
Без претретмана	84,1±1,8	84,0±1,8	83,9±1,8	83,8±1,8	-226,8 ±3,8	-226,9 ±3,6	-227,1 ±3,7	-227,3 ±3,7	156,2	157,4	158,5	160,8
УС-20 kHz	30,6±0,8	30,5±0,8	30,5±0,8	30,4±0,8	-236,6 ±2,8	-236,8 ±2,6	-236,9 ±2,6	-237,2 ±2,7	105,8	107,0	108,2	110,6
Висока температура	70,3±1,5	70,2±1,5	70,2±1,5	70,2±1,5	-228,5 ±3,5	-228,7 ±3,6	-228,8 ±3,7	-229,0 ±3,6	142,9	144,1	145,3	147,6
УК-40 kHz	38,0±1,1	38,0±1,1	37,9±1,1	37,9±1,1	-234,3 ±3,2	-234,4 ±3,4	-234,6 ±3,5	-234,8 ±3,4	112,6	113,8	114,9	117,6

*Легенда:* УС-20 kHz – ултразвучна сонда фреквенце 20±0,2 kHz -15 минута, УС-40 kHz – ултразвучно купатило фреквенце 40±2 kHz-15 минута, висока температура – 75 °С-30 минута.



Осим тога, утврђено је да је смањење вредности  $\Delta H$  и  $\Delta S$  допринело опадању вредности  $\Delta G$ , при чему је промена вредности  $\Delta H$  имала у много већем степену утицај на вредности  $\Delta G$  јер је проценат смањења вредности  $\Delta H$  код ултразвучних претретмана виши од  $\Delta S$ . Претпоставља се да појава опадања вредности  $\Delta H$  и  $\Delta S$  може бити последица повећања афинитета између алкалазе и соницираних протеина беланцета проузрокованог истезањем и одмотавањем молекула протеина услед дејства ултразвучних таласа. Статистички значајно ниже вредности термодинамичких константи приписују се кавитационом ефекту ултразвучне сонде који индукује раскидање водоничних веза и хидрофобног језгра<sup>i</sup> молекула протеина, модификацију аминокиселинских остатака процесом оксидације, али и агрегацију протеина.<sup>264, 276</sup> Наведене вредности процента смањења потврђују претходно поменути чињеницу да је реакција ензимске хидролизе протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом знатно бржа од контролне ензимске хидролизе. Током кинетичке студије хидролизе протеина обезмашћених пшеничних клица претходно соницираних помоћи две врсте уређаја за генерисање ултразвучних таласа, вредности  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  и  $\Delta G$  су такође пратиле тренд енергије активације, а смањења свих вредности су била значајно већа него код хидролизата припремљеног традиционалним поступком.<sup>134</sup> Поређењем ових литературних података и добијених резултата интереснтно је истаћи да су вредности  $\Delta S$  чак три пута више смањење, што наглашава да је претретман ултразвучном сондом знатно побољшао уређење молекула у случају протеина беланцета него протеина пшеничних клица. Сличне резултате саопштили су Ченг (Cheng) и сарадници утврдивши да су вредности термодинамичких параметара ( $E_a$ ,  $\Delta H$  и  $\Delta S$ ) ензимске хидролизе протеина кромпира смањени ултразвучним претретментом, док се  $\Delta G$  незнатно повећава.<sup>283</sup> Јин (Jin) и сарадници су ултразвучним претретманом такође успешно утицали на смањење вредности  $E_a$ ,  $\Delta H$  и  $\Delta S$  ензимске хидролизе протеина глутенског кукурузног оброка, али је за разлику од резултата овог истраживања, соникација имала мали утицај на вредност  $\Delta G$ .<sup>264</sup>

---

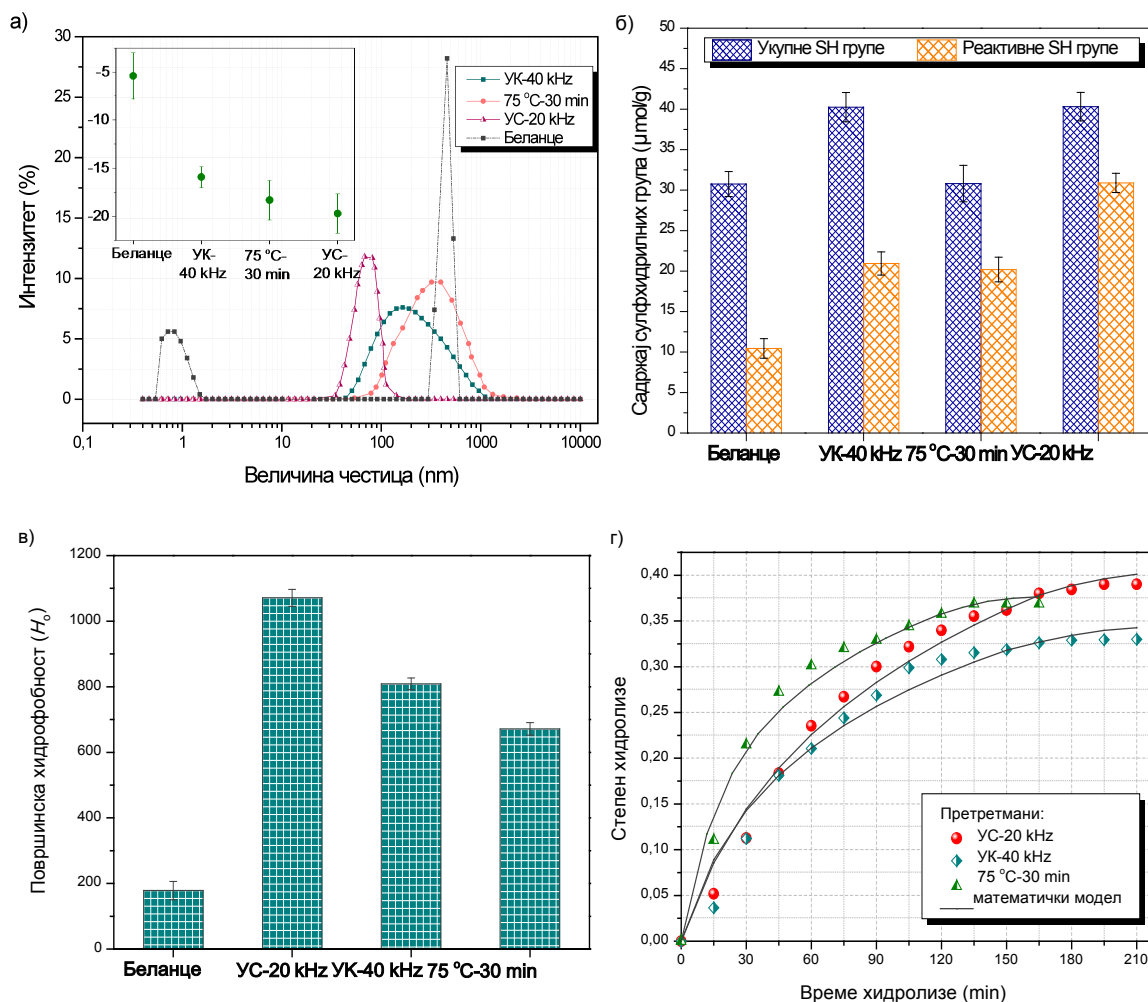
<sup>i</sup> Протеини растворљиви у води у својој структури имају хидрофобно језгро у коме су бочни ланци заклоњени од воде, чиме је стабилизовано увијено стање протеина. Наелектрисани и поларни бочни ланци налазе се на површини изложеној растварачу где интерагују са околним молекулима воде. Смањење броја хидрофобних бочних ланаца изложених молекулима воде главна је покретачка сила за процес увијања протенинских ланаца,<sup>280-281</sup> мада формирање водоничних веза унутар протеина такође стабилизује структуру протеина.<sup>282</sup>

Генерално, добијени резултати термодинамичке анализе јасно показују да је ултразвучни претретман без обзира на врсту био од изузетне користи за реакцију хидролизе протеина беланцета због својих ниских енергетских потреба, али и да је значајно утицао на побољшање ензимске хидролизе.

### *7.2.1.3. Утицај ултразвучног претретмана на површинске карактеристике агрегата протеина беланцета*

У покушају да се боље разумеју претходно дискутовани резултати кинетичке и термодинамичке анализе, пре свега феномен деловања ултразвучних таласа на ензимску хидролизу, у овој фази истраживања испитан је утицај процеса соникације на карактеристике честица протеина беланцета са аспекта расподеле величине честица и са аспекта површинских карактеристика као што су укупно наелектрисање, тј. зета ( $\zeta$ )-потенцијал и површинска хидрофобност. У литератури је познато неколико техника за мерење степена денатурације протеина као што је мерење количине укупних и реактивних сулфхидрилних (SH) група, и у овој фази истраживања употребљене су зарад допуњавања испитивања структурних промена протеина беланета индукованих соницирањем. Да би се упоредио утицај различитих претретмана, претходно приказне криве хидролизе протеина беланцета, при оптималним концентрацијама алкалазе и супстрата моделоване усвојеним математичким моделом, у овом потпоглављу су груписане и упоређене са аспекта степена денатурације протеина и доступности алкалази. Поређења ради, све наведене анализе изведене су и за традиционални топлотни претретман протеина беланцета, ради испитивања могућности замене овог третмана технологијом ултразвука високог интензитета, али и за свеже нативно беланце. Добијени резултати су упоређени и ради јасније прегледности графички приказани на Слици 7.11. и у Табели 7.5.

Очигледно је да обе врсте ултразвучног претретмана узрокују извесне структурне промене молекула протеина беланцета за које се чини да су у корелацији са одмотавањем протеина. У погледу **садржаја укупних и реактивних сулфхидрилних (SH) група**, са Слике 7.11б видљиво је статистички значајно повећање за све испитане претретмане протеина беланцета, али је ипак највеће повећање добијено ултразвучним претретманима протеина беланцета, међу којима је претретман ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz показао значајну предност у односу на ултразвучно купатило фреквенце  $40 \pm 2$  kHz.



**Слика 7.11.** Утицај врсте ултразвучног претретмана на карактеристике агрегата протеина беланцета одређене са аспекта расподеле величине честица (а), површинских карактеристика: зета ( $\zeta$ ) потенцијала *уметнут* (а) и хидрофобности (в), промене садржаја сулфхидрилних група (б) и доступности ензимској хидролизе (г). *Легенда:* УС-20 kHz – ултразвучна сонда фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz -15 минута, УС-40 kHz – ултразвучно купатило фреквенце  $40 \pm 2$  kHz-15 минута, 75 °C-30 min – висока температура, беланце – без претретмана.

Ово повећање садржаја укупних и реактивних сулфхидрилних група објашњава се конформационим променама индукованим ултразвуком који може проузроковати потпуно или делимично одмотавање полипептидних ланаца резултирајући излагању SH група из унутрашњости ка површини молекула. Термички претретман на високој температури од 75 °C испољио је минималан допринос промени SH група. Конкретно, применом термичког тремана нису уочљиве значајне разлике између

садржаја укупних SH група у поређењу са контролним узорком без претретмана ( $p > 0,05$ ), док је садржај реактивних SH група повећан ( $p < 0,05$ ). Следствено, термичко третирање протеина беланцета у трајању од 30 минута чини се да доводи до изложености реактивних сулфхидрилних група услед одмотавања молекула протеина, али са пропратном агрегацијом доводи до смањења садржаја укупних сулфхидрилних група и вероватно до повећања интрамолекулских дисулфидних (S-S) веза.

Главна улога сулфхидрилних група лежи у дефинисању и стабилизовању тродимензионалне структуре протеина, тако да се прва индикација постојања основних структурних промена ултразвучно третираних протеина беланцета огледа управо у детектовању промене садржаја сулфхидрилних група. Соницирање ултразвучном сондом може проузроковати раскидање постојећих протеинских агрегата, а SH групе могу учествовати у овом феномену смањењем броја интрамолекулских S-S веза одговорних за одржавање агрегатне структуре. Литературно је познато да се активност ензима и структурна својства протеина могу модификовати ултразвучним третманом углавном због његовог физичких и сонохемијских ефеката. Хемијски утицај соникације првенствено је резултат дејства интермедијерних слободних водоничних и хидроксилних радикала и водоникпероксида произведених услед ултразвучне кавитације мехурова. Настали интермедијери могу да узрокују раскидање дисулфидних веза.<sup>162, 284</sup> Стога, истраживачи наглашавају да је садржај  $H_2O_2$  настао током соникације протеина, ефикасан показатељ сонохемијског ефекта и истичу да је одређен квантитативан садржај  $H_2O_2$  износио  $13,22 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ . Међутим, за симулацију потенцијалног хемијског утицаја ултразвука било им је потребан два пута већи садржај  $H_2O_2$ .<sup>269</sup> Следствено, прелиминарна претпоставка у оквиру овог научног истраживања односила се на настајање слободних радикала и  $H_2O_2$  и њихов утицај на структурне промене молекула протеина беланцета.

Слично приказаним резултатима са Сlike 7.11б, саопштено је да ултразвучни претретман пречишћеног протеина  $\beta$ -лактоглобулина утиче на повећање садржаја реактивних SH група и површинске хидрофобности, сугеришући на конформационе промена протеина које могу довести то делимичног или потпуног одмотавања полипептидних ланаца.<sup>150</sup> Штавише, истраживање спроведено на овотрансферину, модел протеину беланцета, показало је да се садржај реактивних SH

група повећао за више од 30% и 80% за узорке сонициране ултразвучном сондом фреквенце 60 kHz током 240 и 480 s, редом.<sup>147</sup> Поредећи наведене вредности повећања садржаја реактивних SH група са резултатима овог истраживања, закључује се да је приближно исто повећање након соницирања сондом  $20 \pm 0,2$  kHz оставрено после 15 минута (чак 3,75 пута дужим третирањем). Овако различити резултати могу се објаснити податком броја S-S веза унутар сваког појединачног протеина беланцета који је различит<sup>k</sup>, као и чињеницом да су експериментни овог истраживања спроведени са комплексном смешом протеина беланцета (не само са једним модел протеином). Због тога је неопходно дужи време соницирања како би се раскинуо већи број S-S веза унутар комплексне смеше протеина беланцета. Такође, Ксионг (Xiong) и сарадници известили су о значајном повећању садржаја сулфхидрилних група као резултат ултрасоницирања овалбумина, али су у овом случају потврђене промене секундарне структуре и постојање мањих структурних подјединица применом циркуларног дихроизма.<sup>148</sup> Супротно овим литературним подацима, у другој студији објављене су и значајне промене садржаја сулфхидрилних група са аспекта повећања и промене на нивоу секундарне структуре сојиних протеинских инхибитора трипсина као резултат деловања ултразвучних таласа фреквенце 20 kHz генерисаних ултразвучним хомогенизатором.<sup>287</sup> Ипак, о разноликости резултата везаних за утицај ултразвучних третмана на садржај сулфхидрилних група, сведочи и истраживање Голсерена (Gülseren) и коаутора у којем су детектоване промене секундарне структуре албумина из говеђег серума, док је количина слободних сулфхидрилних група смањена након деведесетоминутног излагања ултразвучним таласима калориметријске снаге  $20 \text{ W/cm}^2$ .<sup>272</sup> Ови истраживачи су објашњење за своје резултате нашли у стварању протеинских агрегата,<sup>272</sup> како што је случај у овом истраживању код узорака протеина беланцета изложених топлотном дејству високој температури. Стога, закључује се да је деловање ултразвучних таласа на протеине веома комплексно како због варијабилности параметара (дужина трајања третмана, фреквенца и снага) самог ултразвучног третмана тако и индивидуалних структурних разлика нативних протеина и њихових смеша.

С обзиром на очигледне промене садржаја сулфхидрилних група, степен денатурације испитан је и са аспекта **доступности ензимској хидролизе** и брзине

---

<sup>k</sup> Најзаступљенији протеин у беланцету, овалбумин, има само једну дисулфидну везу, овогтрансферин чак петнаест, овомуцин девет, а лизозим свега четири.<sup>7, 285-286</sup>

ензимске реакције (Слика 7.11г). У поређењу са термичким претретманом и третманом ултразвучним таласима у воденом купатилу, претретман ултразвучном сондом у трајању од 15 минута је, како је претходно детаљано објашњено (пододељци 7.2.1.1 и 7.2.1.2), значајно утицао на брже одигравање реакције хидролизе и на добијање поновљивих и репрезентативних резултата високог степена хидролизе.

Утицај различитих претретмана на карактеристике агрегата протеина беланцета са аспекта **расподеле величине честица** и површинске карактеристике као што су укупно наелектрисање, тј. **зета ( $\zeta$ )-потенцијал и површинска хидрофобност**, приказан је на Слици 7.11а, *уметнут(а)*, в. Анализом криве нетретираниог нативног беланцета уочава се бимодална расподела величине честица са пиком високог интензитета у опсегу величина 300-600 nm и пиком мањег интензитета у опсегу 0,5-1,1 nm, а сама расподела може се окарактерисати као широка због високе вредности полидисперзног индекса (PdI)<sup>1</sup>. Евидентно је да се, код узорака протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz, упоредо са повећањем садржаја сулфхидрилних група јавља смањење средње величине честица и промена расподеле величине честица. Запажена појава може се приписати ефекту дејства ултразвучних таласа, генерисаних сонотродом, који доводе до раскидања интрамолекулских веза протеина одговорних за формирање агрегата и настајања мањих честица чија се расподела карактерише израженијим пиковима (Слика 7.11а). Анализом кривих ултразвучног претретмана изведеног у купатилу и претретмана високом температуром, јасно је да криве расподеле величине честица представљају полимодалне криве са значајним пиковима при вредностима изнад 100 nm, док претретман ултразвучном сондом доводи до изражајнијих промена у расподели величине честица формирајући агрегате мањих пречника (пик изнад 60 nm), при чему највиши проценат агрегата представљају честице пречника мањих од 100 nm. Поред израженог померања ка мањим пречницима агрегата, претретман ултразвучном сондом проузорковао је и смањење полидисперзног индекса. Исто тако, после дејства ултразвучних таласа фреквенце  $40 \pm 2$  kHz генерисаних преко ултразвучног купатила, приметно је значајно смањење величине агрегата молекула протеина ( $p < 0,05$ ), али не у мери у којој је то случај после третмана ултразвучном сондом.

---

<sup>1</sup> Полидисперзни индекс (PdI) приказује информације о ширини укупне расподеле величине честица. У овом истраживању вредности веће од 0,5 указивале су на веома широку расподелу.

Очигледно је да ултразвучним претретманима дошло до смањења средње величине агрегата и може се претпоставити до повећања слободне површине молекула протеина беланцета услед дејства ултразвучних таласа, који не само да утичу на разбијање агрегата, него и на редукцију мањих агрегата раскидајући међумолекулске Ван дер Валс-ове силе (Van der Waals). За оба претретмана, расподела величине агрегата се смањује (ужи пикови), што се потврђује и на основу вредности полудисперзног индекса (Табела 7.5).

Полазна хипотеза о различитости самих конструкција уређаја за ултразвучни претретман може дати објашњење о разлици смањења величине агрегата протеина. Конкретно, ултразвучно купатило коришћено за соницирање протеина беланцета одликује се великом емитујућом површином са које се генеришу механичке вибрације ултразвучних таласа, значајно нижег интензитета у поређењу са ултразвучном сондом. Претретманом у ултразвучном купатилу, директан физички контакт између узорка протеина беланцета и емитујуће површине је изостао, тако да се таласи неравномерно емитују унутар купатила доводећи до атенуације тзв. пригушивања амплитуде, а самим тим и до слабљења јачине ултразвука у току времена. За разлику од купатила, претретманом ултразвучном сондом, сонотрода је била директно уроњена у третиране узорке протеина беланцета услед чега долази до формирања зона са високим притиском, учесталије имплозије мехурића, односно интензивније кавитације, која код купатила није била довољно изражена. Претпоставља се да су код купатила изражајнији ефекти смицајних сила и турбуленције. Са аспекта честичних карактеристика агрегата протеина беланцета, а након дискутованих резултата расподеле величине честица, структурне промене молекула протеина беланцета могу се првенствено довести у везу са делимичним раскидањем интермолекулских хидрофобних интеракција него са раскидањем пептидних или дисулфидних веза. У поређењу са наведеним ултразвучним претретманима, применом термичког третмана долази до снажног утицаја на величину агрегата протеина услед термичке агрегације молекула која је у овом случају проузроковала знатно повећање средње величине (пик изнад 320 nm) и веома широку расподелу величина честица.

Будући да је експериментално потврђено да се протеински агрегати могу разбити на мање честице ултразвучним претретманима, добијени експериментални резултати упоређени су са литературним подацима и у потпуности су у сагласности

са резултатима истраживања Јамбаркове (Jambark) и сарадника.<sup>16</sup> Друга група аутора известила је да се применом термички контролисаног ултразвучног третмана значајно смањује величина агрегата нативних протеина беланцета и истакли су да је процес соникације веома ефикасан за припрему наночестица.<sup>15</sup> Исто тако, из литературних података уочено је значајно смањење величине честица након соничирања неколико биљних и животињских протеина, при чему се истиче да долази до раскидања нековалентних веза, електростатичких и хидрофобних интеракција одговорних за одржавање структуре протеинских агрегата.<sup>154</sup> Месенс (Messens) и коатури у својој студији истакли да ултразвучни претретман недовољног интензитета узрокује током третмана протеина акустична трења и турбуленције, али да не доводи до стварања довољно високог негативног притиска неопходног за настанак имплозије мехурова, тј. кавитације. Зато се оваквим претретманом делује на површинске карактеристике протеина.<sup>288</sup>

**Табела 7.5.** Вредности величине и наелектрисања агрегата протеина беланцета при дејству различитих претретмана.

Узорци	Средња величина агрегата (nm)	Полудисперзни индекс	ζ-потенцијал (mV)	Кондуктивност (mS/cm)
Беланце	383,3±11,92	0,532±0,011	-5,41±2,40	0,007
УК-40 kHz	162,6±8,51	0,437±0,015	-15,9±1,10	0,094
75 °C-30 min	321,2±10,34	0,504±0,020	-18,3±2,05	0,108
УС-20 kHz	69,8±6,92	0,389±0,012	-19,7±2,06	0,121

*Легенда:* УС-20 kHz – ултразвучна сонда фреквенце 20±0,2 kHz -15 минута, УС-40 kHz – ултразвучно купатило фреквенце 40±2 kHz-15 минута, висока температура – 75 °C-30 минута.

Као што је графички приказано на Слици 7.11 *уметнут* (а), али и навођењем вредности у Табели 7.5, значајан пораст **вредности ζ-потенцијала** ( $p < 0.05$ ) након ултразвучних претретмана је очигледан и може се приписати структурном преуређивању молекула протеина беланцета као резултату дејства кавитације. Евидентно је да колоидни системи протеина беланцета, како нативног беланцета тако и беланцета са различитим претретманима, имају негативне вредности ζ-потенцијала. Негативне вредности приказаних система беланцета приписују се негативном наелектрисању молекула протеина, а највише вредности ултразвучно претретраних протеина указују на чињеницу о постојању више негативних карбоксилних група, док терминалне аминокиселине групе након соничирања постају



неутралне.<sup>289</sup> Литературно, повећање вредности  $\zeta$ -потенцијала протеина беланцета забележено је након третирања (800  $\mu$ s) пулсним електричним пољем (-9,9 mV).<sup>290</sup> Поређењем података из Табеле 7.5 са литераурним резултатима закључује се да је ултразвучни претретман значајно допринео одржавању стабилности колоидног система протеина беланцета у односу на претретман пулног електричног поља. Такође, резултати јасно указују на побољшање система након соницирања са аспект стабилности и електрокинетичког потенцијала. Повећање негативног наелектрисања приписано је електростатичким одбијањем молекула које је по свему судећи утицало на разарање протеинских агломерата и тиме значајно редуковало агломерацију и флукуације молекула протеина беланцета. Забележено повећање електростатичких одбијних сила, такође, утиче и на садржај сулфхидрилних група, тако да се поредећи резултате садржаја сулфхидрилних група (Слика 7.11б) и резултате  $\zeta$ -потенцијала (Слика 7.11а, Табела 7.5) констатује позитивна корелација. Исто тако, резултати су у сагласности са илустрованим резултатима са Слика 7.11г на којима је евидентно да је претретман ултразвучним таласима значајно ( $p < 0,05$ ) унапредио ензимску хидролизу протеина беланцета са аспекта степена хидролизе и брзине реакције, а резултати су такође у сагласности са литературним подацима Лиуа (Liu) и коаутора.<sup>291</sup> Све наведено је најизраженије код узорка протеина беланцета претретираних ултразвучним таласима генерисаним сондом, за које можемо констатовати да представљају најстабилнији дисперзни систем са довољном количином негативног наелектрисања чиме је спречена агломерација и флукуација.

Површинске карактеристике агрегираних протеина на основу којих се могу проценити и потврдити конформационе промене молекула протеина јесте **хидрофобност ( $H_0$ )**, а као основни предуслов за задовољавајућу површинску активност истраживачи истичу наелектрисање и површинску хидрофобност.<sup>197</sup>

Евидентно је да претретирањем протеина беланцета ултразвучним таласима, различитих фреквенци и различитог начина извођења, долази до значајног ( $p < 0,05$ ) повећања вредности површинске хидрофобности у поређењу са нативним нетретираним узорком беланцета чија је вредности износила 178,23. Повећање вредности  $H_0$  забележено је и применом конвенционалног термичког претретмана. Претретман ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz допринео је највећој промени  $H_0$ . Наиме, вредност површинске хидрофобности је у односу на нативно беланце повећана  $\sim 6$  пута, док је ово повећање применом ултразвучног купатила

фреквенце таласа  $40 \pm 2$  kHz износило  $\sim 4,5$  пута. Према наведеним подацима, могуће је констатовати да су оба ултразвучна претретмана утицала на одмотавање полипептидних ланаца протеина беланцета и нарушавање хидрофобних међумолекулских интеракција. Овиме, хидрофобне групе и молекулски домени из унутрашњости структуре постали су доступни молекулима растварача, и како истраживачи истичу, глобуларна структура протеина је нарушена, па хидрофобни домени могу несметано да реагују електростатичким интеракцијама са флуоресцентном анјонском бојом коришћеној у анализи.<sup>292-293</sup> Термички претретман је у поређењу са ултразвучним таласима условио значајно нижу вредност површинске хидрофобности која је износила 371,22. Претпоставља се да је овакав резултат последица агрегације и флукуације молекула протеина беланцета услед деловања топлоте на високој температури. Агрегати настали услед термичке денатурације заштитно су деловали на хидрофобне регионе молекула протеина и на тај начин смањили број доступних хидрофобних група које би интераговале са анјонском флуоресцентном бојом. Прегледом доступне литературе и поређењем са приказаним резултима (Слика 7.11г) уочава се сличност. Конкретно, површинска хидрофобност албумина из говеђег серума такође је повећана после четрдесетпетоминутног ултразвучног третмана сондом (калориметријске снаге  $20 \text{ W/cm}^2$ ),<sup>272</sup> док је повећање хидрофобности концентрата сурутке забележено већ после 5 минута применом ултразвука високог интензитета.<sup>294</sup>

Генерално, постоје бројна контрадикторна истраживања о утицају ултразвучних третмана како средњег тако и високог интензитета на површинске, структурне и функционалне карактеристике нативних протеина. Резултати у овим посматраним истраживањима у највећој мери зависе од комбинације ултразвучног претретмана и врсте протеина. Друге компоненте (шећери, липиди и остала органска једињења) присутне у варијабилним концентрацијама у испитиваним системима такође могу утицати на резултате. Како је један од циљева овог истраживања био да се квантитативно испита утицај деловања ултразвучних претретмана на протеине беланцета као важних прехранбених протеина, овом фазом истраживања са аспекта кинетике једноступеног ензимског поступка хидролизе применом алкалазе, али и са аспекта површинских промена агрегираних протеина, откривен је изузетан потенцијал дејства ултразвука на протеине беланцета и припреми протеинских

хидролизата високе нутритивне и биолошке вредности, због чега је његова примена у реалним прехранбеним системима и те како оправдана.

### **7.2.2. Утицај процесних параметара на кинетику двостепеног поступка ензимске хидролизе протеина беланцета**

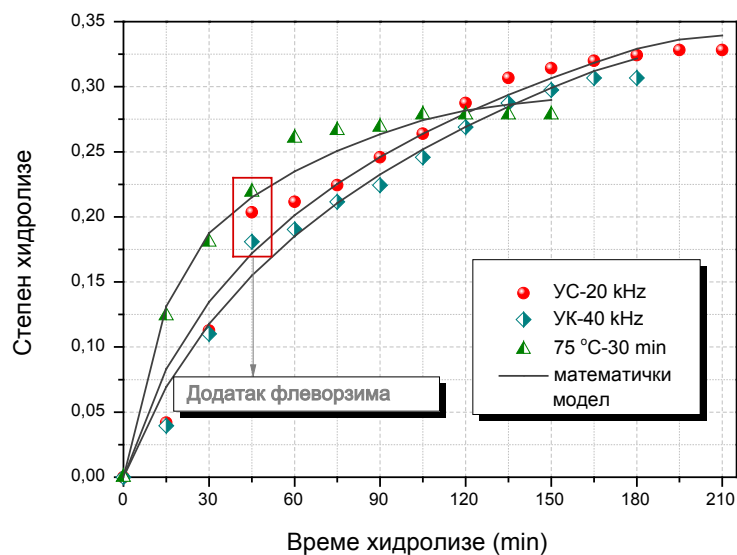
Како је у претходној фази оптимизације ензимске хидролизе применом различитих врста протеолитичких ензима у двостепеном ензимском поступку (одељак 7.1.3), са аспекта оствареног степена хидролизе, али и са аспекта укупне биолошке активности припремљених хидролизата, усвојена комбинација ензима алкалазе и флеворзима, кинетичка студија је у овој фази управо испитана са овом комбинацијом. Идентично кинетичкој анализи једностепеног ензимског поступка, код кинетичке студије двостепеног ензимског поступка хидролизе протеина беланцета за математичко моделовање и одређивање кинетичких константи употребљен је претходно усвојен (одељак 7.2.1) полу-емпиријски кинетички модел који узима у обзир дезактивацију ензима и инхибицију супстратом у вишку, по коме је реакција хидролизе реакција другог реда. Валидност овог математичког модела испитана је праћењем почетне кинетике испитивањем утицаја процесних параметара: почетне концентрације првог ензима-алкалазе (1,56; 2,12 и 2,83 AU) и почетне концентрације супстрата (5; 7,5; 10 и 20 mg/cm<sup>3</sup>, садржај протеина одређен стандардном методом по Кјелдалу, N×6,25;  $E/S$  однос вариран у опсегу 0,29-1,18 AU/g протеина) у шарном реактору са механичким мешањем. У свакој серији експеримената, други ензим-флеворзим додаван је у константној концентрацији која је износила 2,12 AU ( $E/S$  однос 0,59 AU/g протеина).

Идентично једностепеном поступку хидролизе описаном у одељку 7.2.1, временом долази до повећања брзине реакције двостепене хидролизе протеина беланцета, степен хидролизе тежи граничној равнотежној вредности повећавајући се са порастом почетне концентрације ензима (*резултати нису приказани*). Најнижи степени хидролизе за све анализиране претретмане остварени су при најмањој почетној концентрацији алкалазе од 1,56 AU и концентрацији флеворзима 2,12 AU. У случају када је доступна довољна концентрација супстрата повећање почетне концентрације алкалазе довело је до повећања почетне брзине реакције двостепене хидролизе протеина беланцета. Незнатна разлика у почетним брзинама и крајњим степенима хидролизе забележена је међу концентрацијама алкалазе 2,12 и 2,83 AU, у

случају оба ултразвучна претретмана, што указује на чињеницу да је при високим концентрацијама ензима дошло до стерних сметњи и отежане адсорпције молекула алкалазе и флеворзима услед смањења броја доступних везујућих места на молекулима супстрата. Разматрајући ефикасност претретмана на промену почетне брзине и ток ензимске хидролизе, претретман ултразвучном сондом показао се као значајно ( $p < 0,05$ ) ефикаснији у поређењу са претретманом изведеним у ултразвучном купатилу и термичким претретманом, очигледно позитивно утичући на ензимску активност и на тај начин омогућујући постизање већих степена хидролизе при нижим концентрацијама ензима. Забележено повећање почетне брзине реакције хидролизе протеина беланцета претретраних ултразвучном сондом последица је интензивног деловања кавитације индуковане сондом, чији је утицај детаљно истражен у претходном одељку 7.2.1. Повећање концентрације протеина беланцета узрокује значајно ( $p < 0,05$ ) смањење степена хидролизе, али и брзине реакције, а највећи степени хидролизе остварени су при најнижим концентрацијама протеина од  $5 \text{ mg/cm}^3$ , на основу чега је и у двостепеном поступку хидролизе евидентна инхибиција супстратом (*резултати нису приказани*). То значи да супстрат активно утиче на дезактивацију ензима и да број хидролизованых веза није кључни фактор који контролише реакцију хидролизе. Експериментални резултати почетне кинетике двостепеног ензимског поступка при различитим концентрацијама алкалазе и супстрата, као и код једностепеног, показују добро слагање са полу-емпиријским кинетичком моделом који узима у обзир дезактивацију ензима и инхибицију супстратом у вишку, по коме је реакција хидролизе реакција другог реда.

Експерименталне криве зависности степена хидролизе пептидних веза израженог само као однос пептидних веза хидролизованых у тренутку  $t$  и укупног броја пептидних веза у протеинском супстрату беланцету од времена, при оптималним почетним концентрацијама алкалазе (2,12 AU) и супстрата ( $10 \text{ mg/cm}^3$ ) у првом ступњу, и константне концентрације флеворзима у другом ступњу (2,12 AU), филоване су усвојеним кинетичким моделом и приказане су на Слици 7.12. Упоредо са спровођењем анализа почетне кинетике, кинетички параметри  $a$  и  $b$  су испитани непосредно пре утврђивања брзине реакција ензимске хидролизе протеина беланцета, док су вредности израчунате нелинеарном регресионом анализом дате у Табели 7.6. Детаљније, конструисањем правих зависности  $a^{-1} \sim e_0^{-1}$ ,  $b^{-1} \sim s_0$  и  $r^{-1} \sim s_0^{-1}$  (Слика 7.13) и одређивањем одговарајућих нагиба и одсечека, а затим комбиновањем

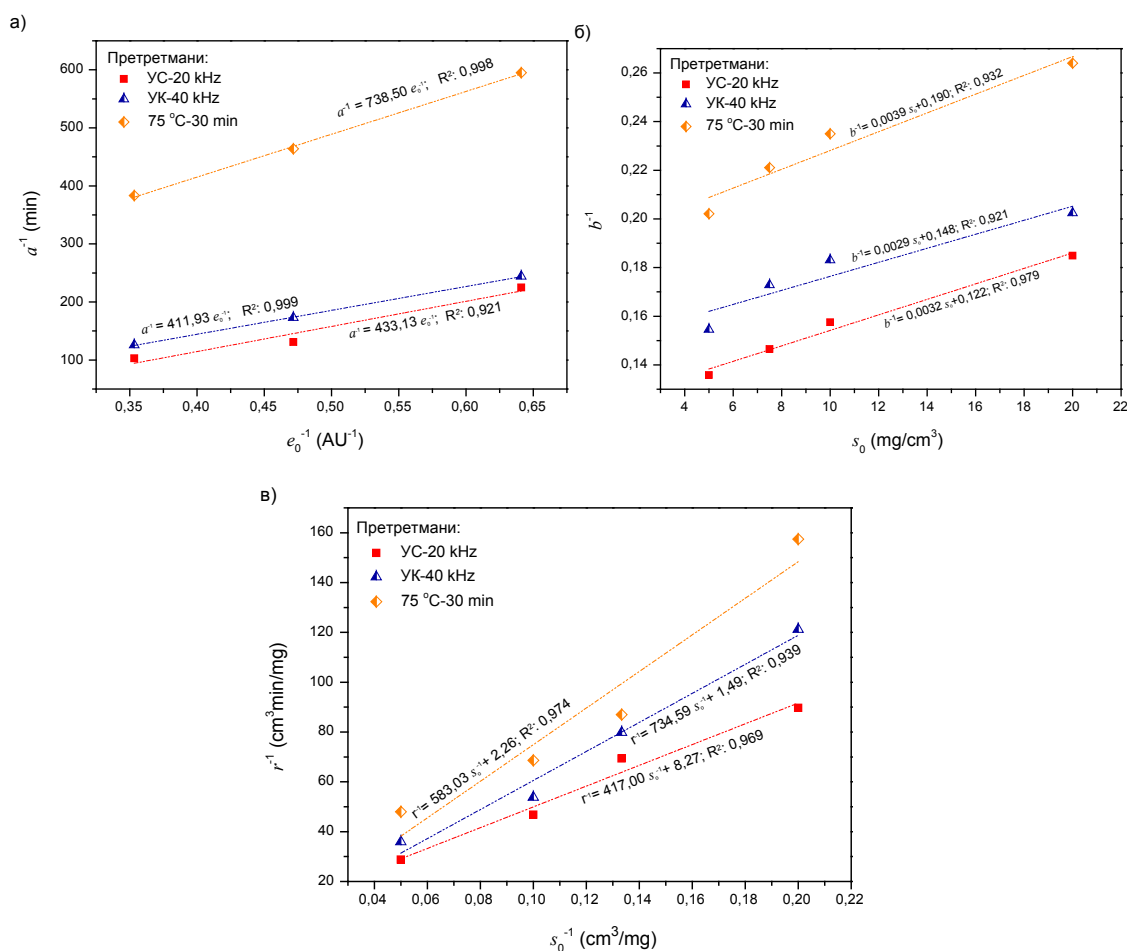
са једначинама (4.16) и (4.17) из потпоглавља 4.3 израчунате су вредности кинетичких константи  $k_2$  ( $\text{min}^{-1}$ ),  $K_I$  ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) и  $k_d$  ( $\text{min}^{-1}$ ).



**Слика 7.12.** Утицај врсте претретмана на кинетику двостепеног ензимског поступка хидролизе протеина беланцета у шаржном реактору са механичким мешањем, при оптималним почетним концентрацијама алкалазе (2,12 AU) и супстрата ( $10 \text{ mg}/\text{cm}^3$ ) у првом ступњу, и константне концентрације флеворзима у другом ступњу (2,12 AU). Претретмани: УС-20 kHz – ултразвучна сонда фреквенце  $20 \pm 0,2 \text{ kHz}$  -15 минута, УС-40 kHz – ултразвучно купатило фреквенце  $40 \pm 2 \text{ kHz}$ -15 минута, 75 °C-30 min – висока температура, контрола – без претретмана.

**Табела 7.6.** Вредности кинетичких константи  $k_2$ ,  $K_I$  и  $k_d$  у студији ензимске хидролизе различито претретираних протеина беланцета.

Претретман	$k_2$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_I$ ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )	$k_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )
Ултразвучна сонда 20 kHz	$0,029 \pm 0,002$	$48,7 \pm 4,4$	$0,24 \pm 0,02$
Ултразвучно купатило 40 kHz	$0,029 \pm 0,001$	$51,0 \pm 3,6$	$0,20 \pm 0,03$
75 °C-30 min	$0,016 \pm 0,003$	$38,1 \pm 8,4$	$0,09 \pm 0,04$



**Слика 7.13.** Графички приказ зависности кинетичких параметара и почетне брзине реакције двостепене ензимске хидролизе протеина у функцији почетне концентрације алкалазе и супстрата: (а) зависност  $a^{-1}$  и  $e_0^{-1}$ , (б) зависност  $b^{-1} \sim s_0$  и (в) зависност  $r^{-1} \sim s_0^{-1}$  за ензимски поступак хидролизе претретираних протеина беланцета. *Легенда:* УС-20 kHz – ултразвучна сонда фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz -15 минута, УС-40 kHz – ултразвучно купатило фреквенце  $40 \pm 2$  kHz-15 минута, 75 °C-30 min – висока температура.

Евидентно је да се израчунате вредности кинетичких параметара двостепеног ензимског поступка хидролизе протеина беланцета значајно разликују ( $p < 0,05$ ) у зависности од врсте и начина извођења претретмана протеина, као и да је са променом концентрације ензима и супстрата нарочито за серије експеримената изведене са ултразвучним претретманима уочљив јасан тренд. И у овом поступку, повећањем почетне концентрације ензима долази до повећања вредности параметра  $a$ , док повећање концентрације супстрата изазива смањење истог. Исто тако, брзина реакције двостепене ензимске хидролизе зависи од почетне концентрације ензима и супстрата, и у сагласности је са наведеном променом вредности параметра  $a$  у

функцији концентрације ензима и супстрата. Насупрот параметру  $a$ , параметар  $b$  искључиво зависи од концентрације супстрата чијим се повећањем вредности параметра  $b$  смањују за сва три испитана хидролизата. Зато је кинетички параметар  $b$  окарактерисан као стабилнији у поређењу са параметриом  $a$ , пошто на његове вредности скоро уопште не утичу промене реакционих услова укључујући почетну концентрацију ензима и температуру.

Поређењем израчунатих вредности константи брзине реакције,  $k_2$  (Табела 7.6), као и тока кривих хидролизе моделованих математичким моделом (Слика 7.12), евидентно је да оба ултразвучна претремана протеина беланцета доводе до повећања брзине реакције у односу на термички претретман. Ултразвучним претретманима протеина беланцета приближно два пута се реакција хидролизе одиграла брже у поређењу са хидролизом термички претретираних протеина. Важно је истаћи да су изводећи двостепену хидролизу алкалазом и флеворзимом значајно веће константе брзине незнатно утицале на свеукупни степен хидролизе, тако да је остварен равнотежни степен био већи за 5 и 3%, у случају соничије ултразвучном сондом и у ултразвучном купатулу, редом. С обзиром да је кинетичка студија једноступеног поступка са алкалазом претходно описана (поделељак 7.2.1.1), са аспекта деловања протеолитичких ензима, али и са аспекта економичности процеса, интересантно је поређење са овде приказаним двостепеним поступком. Конкретно, посматрањем вредности константни брзина оба технолошка поступка, у случају ултразвучних претретмана, јасно је да се технолошки поступак изведен алкалазом, вођен до краја, одиграва значајно брже, чак 1,8 пута него технолошки поступак изведен у два корака, алкалазом и флеворзимом. Такође, свеукупни ниво хидролизе је померен у корист једноступеног технолошког поступка, јер је су остварени готово 10% већи равнотежни степени хидролизе, иако је време трајања реакција било идентично. Услед разлике у специфичности, протеазе хидролизују различите пептидне везе и ослобађају карактеристичене олиго- и полипептиде различитих молекулске маса, због чега се разликује и остварен степен хидролизе. Алкалаза је протеаза са ендо-пептидазном активношћу и деловала је на пептидне везе насумично у унутрашњости молекула протеина беланцета, док се чини да је флеворзиму, протеази са ендо-и егзо-пептидазном активношћу, специфичност према пептидним везама протеина беланцета смањена. Овим резултатима у први план истиче се ултразвучни претретман протеина беланцета, као изузетно стимулативан физички третман за

унапређење поступка хидролизе, успешно ослобађање пептида и потенцијалну замену конвенционалног термичког третмана, нарочито у случају развоја система већих размера. Са аспекта економске анализе двостепеног технолошког поступка, пре свега кинетичком студијом, чини се недовољно продуктивно и економски неисплативно додавање другог ензима флеворзима. Додатно, посматрањем вредности константе инхибиције,  $K_i$ , и константе брзине дезактивације ензима,  $k_d$ , види се да изузетно варирају у зависности од примењеног претретмана и да се крећу у опсегу од  $38,1 \pm 8,4 \text{ mg/cm}^3$  и  $0,09 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$  за серије експеримената са термичким третманом до  $48,7 \pm 4,4 \text{ mg/cm}^3$  и  $0,24 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$  за серије експеримената са третманом ултразвучном сондом. Наведено је последица претретмана ултразвучним таласима који узоркује структурне промене молекула протеина беланцета повећавајући доступност пептидних веза за хидролизу алкалазом и флеворзимом, што може утицати и на инхибицију ензима супстратом и њихову стабилности.

Прегледом доступне литературе скоро да нема информација о кинетичкој студији двостепених технолошких процеса ензимске хидролизе протеина, чиме резултати овог истраживања имају значајан научни допринос. Пре свега, овим истраживањем, сложена двостепена реакција хидролизе протеина беланцета, са вредностима коефицијената детерминације већим од 0,97, успешно је моделована полу-емпиријским кинетичким моделом, еквивалентним као и у једноступеном поступку. Претпоставља се да је овакав резултат последица знатно већег утицаја првог ензима, алкалазе, на брзину реакције, али и инхибиторног деловања супстрата у првих 45 минута када се хидролизује скоро 20% укупног садржаја пептидних веза. Зато додатак флеворзима у другом ступњу није значајно утицао на реакциони механизам, а самим тим ни на моделовање експерименталних резултата кинетичким моделом чија је емпиријска једначина експоненцијална функција  $dx/dt = a \cdot \exp(-bx)$ .

Истраживачи који су проучавали вишестепене реакције биолошких молекула итичу да је често отежано квантитативно анализирати експерименталне податке са аспекта кинетике реакције, тачније одређивање расподеле константе брзине сваког корака вишестепене реакције и испитивање зависности свих константи брзине од процесних параметара није једноставно. На пример, на константу брзине може утицати концентрација супстрата који је укључен у реакциони механизам, специфичност ензима, трансмембрански потенцијал који делује на јонске канале, смицајне силе на молекулском нивоу, итд., па оваква зависност може појаснити



механизам сложених биолошких система од интереса.<sup>295</sup> Пажљивим и детаљним истраживањима појединих биолошких молекула у једномолекулским експериментима, за објашњење њиховог кинетичког понашања истраживачи су се позивали на нетривијалну расподелу константе брзине реакције.<sup>296-297</sup> Истраживачи у оваквим случајевима вишестепених реакција уводе поуздане нумеричке интегралне трансформације, при чему се једном интегралном трансформацијом преводе вишестепене реакције и њихови кинетички подаци на одговарајуће једностепене кинетичке податке са расподелом константе брзине реакције. Током ове нумеричке трансформације користили су „метод фазне функције“<sup>298</sup> за руковођење вишестепене реакције.<sup>295</sup> Резултати ензимске хидролизе животињских нативних протеина дигестибилним ензимима указују на чињеницу да се реакција хидролизе одиграва по типу реакционог механизма „један по један“, што значи да се интактни протеини хидролизују у пептиде малих молекулских маса и слободне аминокиселине, али и да се апсорбују у дигестивном тракту у виду једне секвенце.<sup>299</sup> Након свега наведеног, још једном се може истаћи да су резултати овог научног истраживања значајни и да је сложена двостепена реакција хидролизе протеина беланцета успешно моделована полу-емпиријским кинетичким моделом из потпоглавља 4.3.

Након комплетне кинетичке студије једностепеног и двостепеног технолошког поступка хидролизе протеина беланцета, претретираних ултразвучним таласима, могу се изнети следећа генерална запажања. Претретман протеина беланцета ултразвучним таласима, генерисаних ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz и ултразвучним купатилом фреквенце  $40 \pm 2$  kHz, испољава значајано дејство на способност агрегације протеина: величину честица, униформност, хидрофобност и наелектрисање, утичући на садржај сулфхидрилних група и доступност пептидних веза ензимској хидролизе, а следствено и на брзину реакције и кинетику. Кинетички модел који узима у обзир инхибицију супстратом, дезактивацију ензима и другог реда реакцију, показао се погодним за успешно моделовање експерименталних података за све претретмане, али је евидентно да вредности кинетичких параметара у великој мери зависе од примењеног третмана, процесних параметара и поступка извођења хидролизе. Осим наведеног, ултразвучни претретмани, посебно претретман изведен ултразвучном сондом, повећавају афинитет алкалазе и/или комбинације алкалаза и флеворзим према протеиним беланцета повећавају константе брзине реакције

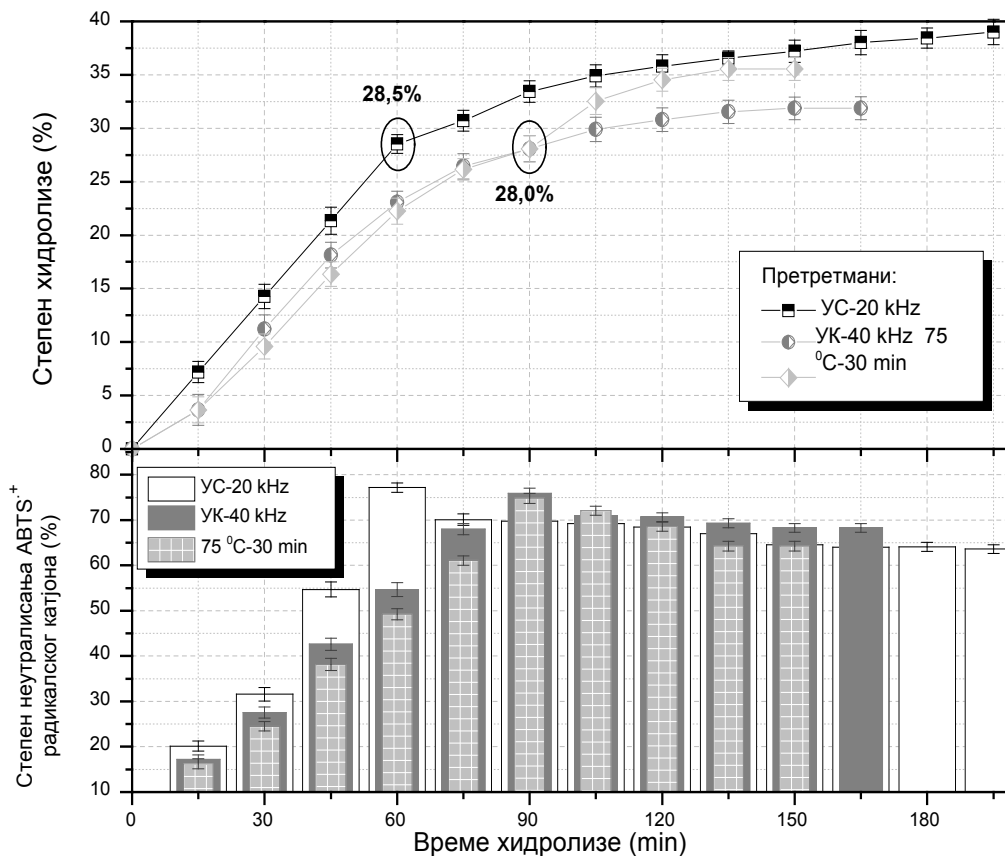
ензимске хидролизе ( $k_2$ ), а смањујући енергију активације ( $E_a$ ), енталпију ( $\Delta H$ ), ентропију ( $\Delta S$ ) и Гибсову слободну енергију ( $\Delta G$ ). Генерално, без жеље за ограничавањем било којом теоријом, могуће је истаћи да је третман ултразвуком високог интензитета изведен сонотродом и/или у купатилу, бар делом, утицао на промену конформације протеина беланцета тако да није дошло до стварања гела, већ је омогућен прилаз ендо-пептидази алкалази до унутрашњих пептидних веза и, на тај начин, њихово лакше раскидање наспрам термичког претретмана. Стога, даља производња биолошки активних пептида протеина беланцета изводиће се са ултразвучним претретманима и то превасходно једностепеним ензимским поступком хидролизе са алкалазом, који се на основу свих досадашњих резултата може усвојити као најадекватнији.

### **7.3. УЛТРАФИЛТРАЦИОНО ФРАКЦИОНИСАЊЕ ХИДРОЛИЗАТА НАТИВНИХ ПРОТЕИНА БЕЛАНЦЕТА**

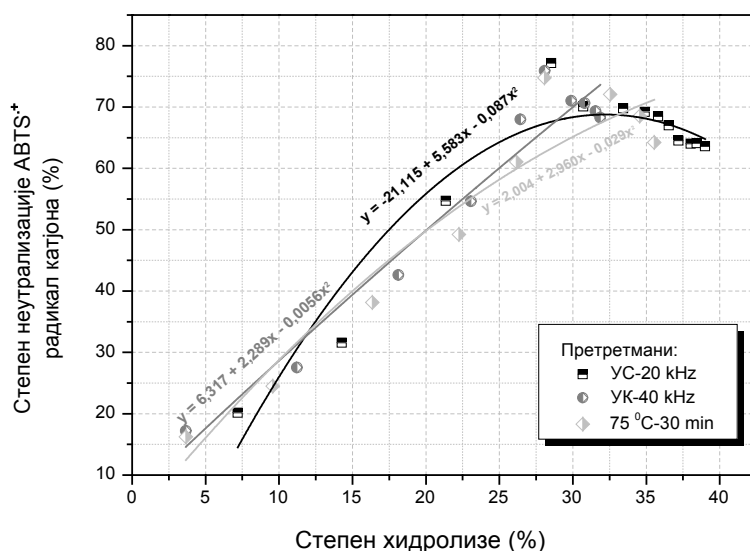
Пошто је основни предмет истраживања ове докторске дисертације био развој иновативног ензимског поступка производње биолошки активних пептида из нативних протеина беланцета, њихово изоловање и карактеризација, наредна фаза истраживања била је усмерена на изоловање пептидних фракција из нутритивно вредних протеинских хидролизата применом сепарационе методе ултрафилтрације. На почетку ове фазе истраживања посебна пажња била је посвећена корелацији између степена хидролизе и антиоксидативне активности, како би се нутритивно вредни хидролизати протеина беланцета тачно дефинисаних степена хидролизе, односно састава полипептидних ланаца могли успешно одвојити на биолошки најактивније фракције пептида.

У овој фази истраживања, претретирани протеини беланцета превасходно су хидролизованом једностепеним ензимским поступком. Ензимска хидролиза изведена је у шаржном реактору са механичким мешањем, а започета је додавањем ендо-пептидазе алкалазе како је описано у одељку 6.3.4. Након додатка алкалазе, у временским интервалима од 15 минута узорковани су узорци протеинских хидролизата, па је током читавог процеса хидролизе мерена антиоксидативна активност и истовремено је разматран утицај претретмана на антиоксидативну активност. Како је у првој фази истраживања прелиминарна антиоксидативна активност испитана мерењем способности неутралисања DPPH<sup>•</sup> радикала, а добијене

вредности нису прелазиле 40%, сада је антиоксидативна активност тестирана методом која се разликује од претходне по механизму реаговања пептида са радикалима. Наиме, антиоксидативна активност мерена је ABTS методом, а резултати корелације степена хидролизе и степена неутралисања ABTS<sup>•+</sup> радикалног катјона приказани су на дијаграмима илустрованим на Сликама 7.14 и 7.15.



**Слика 7.14.** Ток једностепене ензимске хидролизе претретираних протеина беланца у функцији од времена хидролизе и одговарајуће вредности антиоксидативне активности са аспекта степена неутралисања ABTS<sup>•+</sup> радикалног катјона при различитим постигнутим вредностима степена хидролизе. Степен неутрализације ABTS<sup>•+</sup> радикал катјона за нативно нетретирано беланце и за хидролизат истог са степеном хидролизе 17,3% били су  $7,69 \pm 1,59\%$  и  $30,4 \pm 1,59\%$ , редом.



**Слика 7.15.** Корелација између антиоксидативне активности изражене преко степена неутралисања  $ABTS^{\bullet+}$  радикалског катјона и степена хидролизе.

Из приказаних резултата на Слици 7.14 очигледно је да претретман протеина беланцета изведен ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz у трајању од 15 минута доводи до значајних промена ( $p < 0,05$ ) целокупног тока ензимске хидролизе у времену. Такође, евидентно је да врста, као и начин извођења ултразвучног претретмана значајно утиче на антиоксидативну активност припремљених хидролизата протеина беланцета. Евидентно је да током првих 60 и/или 90 минута тока хидролизе вредности степена неутралисања  $ABTS^{\bullet+}$  радикалског катјона расту, а потом се постепено смањују са временом трајања реакције, указујући на чињеницу да су степен хидролизе и антиоксидативна активност међусобно веома зависни, тј. да су у корелацији. У поређењу са нетретираним нативним беланцетом чија је вредност степена неутралисања радикала износила  $7,69 \pm 1,59\%$ , сви хидролизати претретираних протеина беланцета већ након 15 минута хидролизе показују значајно, 2-3 пута већу антиоксидативну активност. Највеће антиоксидативне активности остварене су током 60, 90 и 90 минута са вредностима степена неутралисања  $ABTS^{\bullet+}$  радикалског катјона  $77,17 \pm 1,03$ ,  $75,89 \pm 1,14$  и  $74,78 \pm 1,11\%$  за хидролизате протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом, у ултразвучном купатилу и термички, редом. Процењено је да су наведене вредности антиоксидативне активности постигнуте за степене хидролизе  $\sim 28\%$  и претпоставља се да је управо при овом степену хидролизе протеина беланцета алкалазом постигнут посебан састав ослобођених полипептида и пептида. Међутим, хидролизом преко

наведених 28% укупно хидролизованних пептидних веза, пептиди који су формиран и подлежу даљој хидролиз и претпоставља се да из њих потичу различите инактивне фракције пептида који поседују смањену антиоксидативну активност. Због тога се чини очигледно да степен хидролизе протеина беланцета претретираних ултразвучним таласима мора бити на одговарајућем нивоу како би се ослободили пептиди са највећом антиоксидативном активношћу. Литературни подаци истичу да се током ензимске хидролизе, пептиди са антиоксидативним својствима могу континуирано формирати и деградирати, зависно од њихове молекулске структуре која је првенствено условљена условима хидролизе.<sup>300</sup> Наведени експериментални резултати указују на неопходност проналаска разумног компромиса између постигнутог степена хидролизе тј, приноса пептида или продуктивности ензимског процеса и антиоксидативне активности (Слика 7.15). Осим тога, висока концентрација пептида може такође допринети побољшању антиоксидативне активности хидролизата, а она је уско повезана са концентрацијом супстрата. Са дијаграма корелације (Слика 7.15) јасно је да степен хидролизе зависи, тј. да је у очигледној корелацији са антиоксидативном активношћу и да је корелација описана регресионом једначином која је полином другог реда за сва три претретмана, са високоим коефицијентима детерминације ( $R^2 > 0,936$ ). Наиме, утврђено је да са порастом степена хидролизе до око 28% повећава се и антиоксидативна активност, док при већим степенима хидролизе нагло опада. Међутим, иако је способност неутралисања  $ABTS^{+}$  радикала при степенима хидролизе већим од 28%, код узорака протеина беланцета претретираних термички, незнатно смањена, јасна корелација између антиоксидативне активности и степена хидролизе је очигледна.

Наведено је у складу са неколико научних студија у којима је саопштена корелација између антиоксидативне активности и степена хидролизе пре свега са аспекта смањења величине пептида. Међутим, нека истраживања су утврдила значајно смањење антиоксидативне активности са повећањем степена хидролизе протеина беланцета.<sup>301</sup> Ипак, према сазнањима Тсоу (Tsou) и сарадника ограничена хидролиза протеинских супстрата је неопходна да би се одржала структура или секвенца активних пептида и тиме осигурала њихова функционалност и биолошка активност.<sup>302</sup> Корелације између степена хидролизе и антиоксидативне активности протеина беланцета идентичне успостављеној корелацији у овом истраживању пронађене су у литературним резултатима Чена (Chen) и сарадника,<sup>231</sup> као и Сана

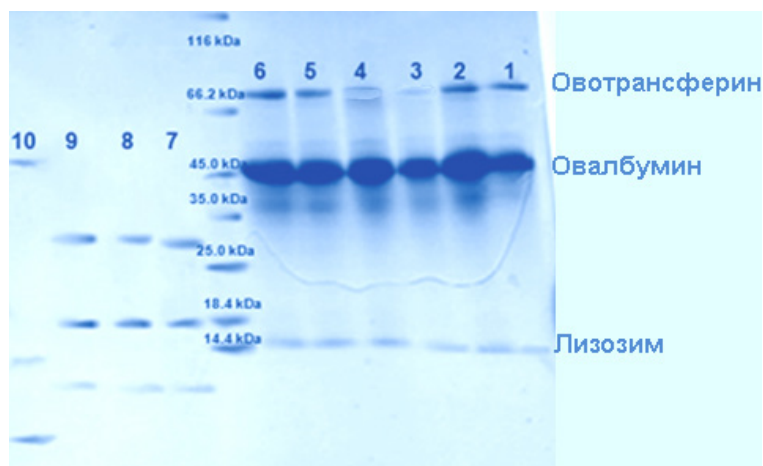
(Sun) и коаутора.<sup>303</sup> Истраживање Сана (Sun) и коаутора је показало да протеински хидролизат беланцета добијен пепсином са степеном хидролизе 16,9% поседује највеће вредности антиоксидативних активности, да даљим током хидролизе активност значајно опада, али да се највећа редукујућа моћ осварује са хидролизатом који има највиши степен хидролизе 18,2%.<sup>303</sup> У другом случају, хидролизат протеина беланцета припремљен трипсином са степеном хидролизе од 12,4% имао је највећу антиоксидативну активност.<sup>231</sup> Различитост остварених степена хидролизе и антиоксидативне активности међу хидролизатима протеина беланцета из овог истраживања и претходних литературних резултата могуће је приписати одређеној специфичности коришћене протеазе алкалазе и дејству ултразвучних претретмана којима је доступност пептидних веза протеина беланцета алакази значајно повећана. Проучавањем антиоксидативне активности протеинских хидролизата сурими отпада истраживачи су дошли са сазнања да антиоксидативна активност није директна функција степена хидролизе, а да у великој мери зависи од аминокиселинског састава и специфичних секвенци аминокиселина у хидролизатима, врсте коришћених протеаза и методе одређивања антиоксидативних својстава.<sup>304</sup> У том контексту, резултати ових аутора показују значајно веће антиоксидативне активности изражене као степен инхибиције ABTS<sup>•+</sup> у хидролизатима припремљених са пепсином и степеном хидролизе 5% и протеазом изолованом из соја *Virgibacillus* sp. SK33 са степеном хидролизе 13%, у поређењу са хидролизатима хидролизованых до степена 27% и 11%, алкалазом и трипсином, редом.<sup>304</sup> Осим наведених литературних података, Кијен (Cian) и коаутори су закључили да су пептиди средње величине (5,5 kDa) првенствено одговорни за неутралисање ABTS<sup>•+</sup> радикалног катјона указујући на чињеницу да су секвенца пептида и њихова конформација најодговорније за антиоксидативну активност.<sup>305</sup>

Генерално, приказани резултати са Сlike 7.14 показују да пептиди који су садржани у припремљеним хидролизатима могу се понашати као донори електрона и реаговати са ABTS<sup>•+</sup> радикалским катјоном прекидајући ланчану радикалску реакцију превodeћи радикалски катјон у стабилан и неактиван производ. Као оптималан степен хидролизе, пре свега ултразвучно претретираних протеина беланцета, издваја се и усваја степен од 28%. Такође, резултати недвосмислено показују да је задржавање одређених делова секундарне структуре протеина, која се налази у дужим олигопептидима и/или дела структуре у полипептидима, неопходно

за изразиту антиоксидативну активност. Следствено, хидролизати протеина беланцета припремљени контролисаном ензимском хидролизом, а самим тим и изоловане пептидне фракције могу бити корисни активни састојци компонената хране или нутрацеутика са потенцијалним биолошким својствима.

### 7.3.1. Утицај ултразвучног третмана на удео ултрафилтрационих фракција пептида

Након детаљног испитивања корелације између степена хидролизе претретираних протеина беланцета и антиоксидативне активности одређивањем степена неутралисања  $ABTS^{*+}$  радикала, непосредно пре ултрафилтрације протеинских хидролизата, одређена је расподела молекулских маса. Конкретно, профил расподеле молекулских маса био је неопходан ради утврђивања величине пора целулозних мембрана кроз које је неопходно пропустити протеинске хидролизате како би се развојили на фракције пептида у што ширем распону молекулских маса. Протеински хидролизати припремљени у једноступеном ензимском поступку хидролизе претретираних протеина беланцета са алкалазом до степена хидролизе 28% развојени су методом вертикалне SDS-PAGE електрофорезе по методи описаној у одељку 6.3.11, а профил расподеле молекулских маса представљен на Слици 7.16. добијен је фотографисањем гела.



**Слика 7.16.** Електрофореграм-приказ расподеле молекулских маса комерцијалних стандарда за електрофорезу, претретираних узорка протеина беланцета и протеинских хидролизата добијених са алкалазом применом SDS-PAGE електрофорезе. *Легенда:* (1) нетретирано нативно беланце, (2) претретман ултразвучном сондом 2 минута, (3) претретман ултразвучном сондом 5 минута, (4) претретман ултразвучном сондом 10 минута, (5) претретман ултразвучном сондом 15 минута, (6) претретман ултразвучном сондом 20 минута,

(7) хидролизат протеина беланцета прететираних ултразвучном сондом 15 минута ( $20 \pm 0,2$  kHz), (8) хидролизат протеина беланцета прететираних у ултразвучном купатилу 15 минута ( $40 \pm 2$  kHz), (9) хидролизат протеина беланцета прететираних у ултразвучном купатилу 15 минута (35 kHz), (10) хидролизат протеина беланцета прететираних термички ( $75$  °C-30 минута).

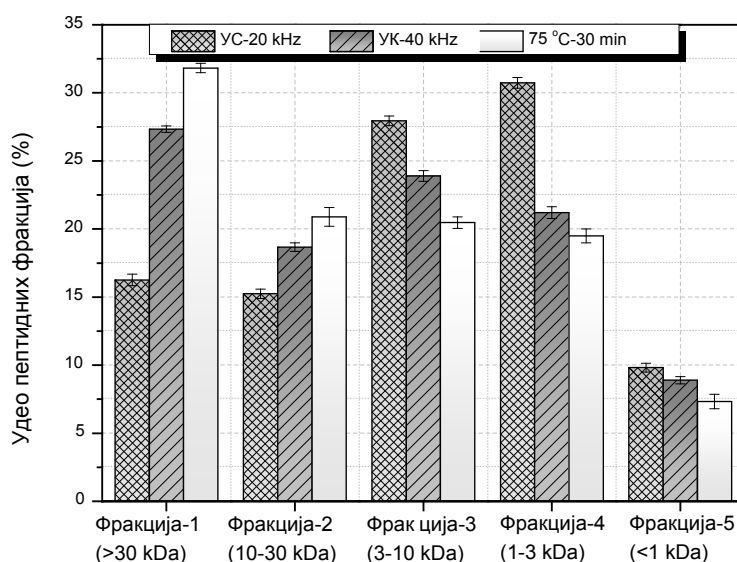
Посматрањем електрофореграма и упоређивањем насталих трака (Слика 7.16) уочава се синергистички ефекат деловања алкалазе и различитих претретмана протеина беланцета који је условио ослобађање протеина и/или полипептида мањих молекулских маса о чему сведоче траке различитог интензитета молекулске масе значајно мање од 14,4 kDa. Интересантно је да је промена интензитета трака које одговарају овотрансферину уочљива за узорке протеина беланцета прететираних ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz, и да зависи од дужине излагања протеина беланцета ултразвучним таласима, али се разлог настанка ових промена на основу електрофорезе не може извести, али засигурно ове промене узроковане су кавитацијским ефектом ултразвучне сонде. Што се тиче хидролизата, трака која представља краће пептиде из хидролизата протеина беланцета прететираних високом температуром указује да је термички третман веома ефикасан у структурној промени главних протеина беланцета већих молекулских маса као што су овотрансферин (76 kDa), овомуцин ( $5,5-8,3 \cdot 10^3$  kDa) и овомукоид (28 kDa), али и лизозима (14,4 kDa). За овај термички добијен хидролизат евидентна је трака средњег интензитета која одговара молекулској маси 45 kDa, али је немогуће на основу електрофореграма објаснити да ли трака потиче од овалбумина или је услед агресивног претретмана дошло до формирања протеинских агрегата ове молекулске масе који нису били подложни протеолитичком деловању алкалазе. Такође, ензимска хидролиза ултразвучно прететираних протеина беланцета довела је значајних промена у профилу расподеле молекулских маса у поређењу са нетретираним нативним узорком беланцета, ултразвучно третираним протеинима и хидролизатом термички прететираних протеина. Међу узорцима три ултразвучна претретмана, на основу електрофореграма, не може се уочити значајна промена, једино је очигледно да су траке за сваки узорак различитог интензитета. Пептидне траке ових хидролизата за које се претпоставља да потичу од хидролизованог протеина, овотрансферина и овалбумина, одговарају молекулским масама 25 и 18,4 kDa, редом. Добијен профил расподеле молекулских маса слаже се са добро познатом



високом специфичношћу деловања алкалазе на унутрашње пептидне везе, при чему је познато да фаворизује хидролизу у делу молекула протеина где се налази дуг ненаелектрисан аминокиселински остатак (P1 позиција) P1-P1' пептидне везе, који интерагује са каталитичким центром ове серинске протеазе.<sup>306</sup> Како у групи комерцијалних маркера за електрофорезу није било маркера молекулских маса мањих од 14 kDa, за траке које одговарају најмањим молекулским масама не може се са сигурношћу тврдити око које се вредности налазе, али искуствено се претпоставља да одговарају маси у распону 3-10 kDa. Приказани резултати расподеле молекулских маса хидролизата протеина беланцета (Слика 7.16) у сагласности су са литературним подацима који указују на присуство две пептидне траке, једне 10 kDa и друге, која одговара масама мањим од 10 kDa, после хидролизе протеина рибљих мишића флеворзимом.<sup>307</sup> Росини (Rossini) и сарадници, такође коришћењем флеворзима у хидролизи казеина, указали су на присуство две пептидне траке процењених молекулских маса на 9 и 14 kDa, док је хидролизом казеина са алкалазом на електрофореграму уочена још једна пептидна трака масе око 21 kDa, а оба узорка хидролизата окарактерисана су добром антиоксидативном активношћу.<sup>306</sup>

Следствено претходним резултатима може се још једном истаћи да су као резултат ензимске хидролизе протеина беланцета, степена хидролизе 28%, добијене комплексне смеше пептида и аминокиселина у којима је појединачни ефекат сваког биолошки активног молекула тешко открити и квантификовати. Осим тога, молекулска маса представља важан параметар који се одражава на ензимску хидролизу протеина, што је додатно у корелацији са биолошком активношћу протеинских хидролизата. Стога, као нови циљ овог истраживања наметнуло се дизајнирање ефикасне методологије фракционисања за сепарацију пептида са циљем побољшања њихових биолошки активних својстава. На основу представљене расподеле молекулских маса, ултрафилтрационо раздвајање хидролизата ултразвучно и термички претретираних протеина беланцета извешено је коришћењем ултрафилтрационе сепарационе јединице и мембрана израђених од регенерисане целулозе различитих величина пора, по принципу сепарације описаном у методи у одељку 6.3.12. Литературни подаци истичу да је употреба ултрафилтрационих мембрана оправдана и изузетно корисна за добијање пептидних фракција жељених молекулских маса из сложене смеше олиго- и полипептида протеинских хидролизата.<sup>307</sup> У циљу што прецизнијег и квантитативно

веродостојног изоловања биолошки активних фракција пептида за фракционисање хидролизата протеина беланцета коришћене су мембране величина пора (*на енгл. molecular weight cut-off, MWCO*) 30, 10, 3 и 1 kDa, а почетни хидролизати су на овај начин раздвојени на пет фракција. Квантитативни садржај и масени удео изолованих фракција пептида, **фракција-1 (>30 kDa)**, **фракција-2 (10-30 kDa)**, **фракција-3 (3-10 kDa)**, **фракција-4 (1-3 kDa)** и **фракција-5 (<1 kDa)**, приказан је на Слици 7.17. Масени удео ултрафилтрационих мембранских фракција пептида израчунат је као однос масе сваке изоловане фракције и масе почетног хидролизата пре ултрафилтрације.



**Слика 7.17.** Профил расподеле молекуларских маса изолованих фракција пептида и њихов удео у зависности од преурењеног претретмана протеина беланцета. Претретмани: UC-20 kHz – ултразвучна сонда фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz -15 минута, UK-40 kHz – ултразвучно купатило фреквенце  $40 \pm 2$  kHz-15 минута, 75 °C-30 min – висока температура.

Без обзира на врсту и начин извођења ултразвучног претретмана протеина беланцета, са Сlike 7.17 првенствено је очигледно значајно смањење ( $p < 0,05$ ) удела изолованих пептида са повећањем опсега величине пептидних фракција, што указује на чињеницу да се хидролизом соницираних протеина беланцета алкалазом веома ефикасно могу произвести пептиди малих молекуларских маса. Са изузетком узорка хидролизата термички претретраних протеина, код соницираних узорка удео изолованих пептида у опсегу маса 1-3 kDa и 3-10 kDa два пута је већи од удела изолованих пептида молекуларске масе веће од 30 kDa. Поред наведеног, важно је указати на очигледност резултата који се тичу разлике профила расподеле молекуларских маса пептидних фракција међу хидролизатима соницираних и термички

третираних протеина беланцета. Конкретно, удео пептидних фракција са пептидима молекулске масе мање од 10 kDa изолованих из хидролизата протеина претретираних ултразвучним таласима фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz, генерисаних ултразвучном сондом, знатно је већи ( $p < 0,05$ ) у поређењу са претретманом у ултразвучном купатилу фреквенце таласа  $40 \pm 2$  kHz и термичким претретманом. На основу удела пептидних фракција, јасно је да су пептиди молекулске масе веће од 30 kDa и оних у опсегу 10-30 kDa, изоловани из узорка хидролизата термички претретираних протеина ( $31,82 \pm 0,34$  и  $20,88 \pm 0,69\%$ , редом), доминантнији у поређењу са истим пептидима из узорка хидролизата соницираних ултразвучном сондом ( $16,26 \pm 0,43$  и  $15,24 \pm 0,34\%$ , редом), док је квантитет изолованих пептидних фракција мањих од 10 kDa обимнији у другом случају ( $30,74 \pm 0,40\%$  наспрам  $19,49 \pm 0,52\%$  за фракције пептида у опсегу 1-3 kDa и  $27,94 \pm 0,35\%$  наспрам  $20,47 \pm 0,42\%$  за фракције пептида у опсегу 3-10 kDa).

Овакви резултати недвосмислено сугеришу да је претретман ултразвучном сондом ефикаснији са аспекта деловања на структуру протеина, што је и показано резултатима у овој дисертацији у пододелку 7.2.1.3, али и да његова примена доводи до различите расподеле молекулских маса након хидролизе алкалазом што би могло утицати на биолошке активности фракција хидролизата. Према механизам одмотавања глобуларних протеина беланцета, тј. промена секундарне структуре услед деловања ултразвучних таласа није довољно разјашњен, литературни подаци истичу неколико кључних разлика у вези делимичног одмотавања протеина глобуларног албумина узрокованог термичким или ултразвучним претретманима.<sup>272, 308</sup> Реч је о механичком, тополотном и хемијском ефекту ултрасоникације који условљава структурне промене протеина услед образовања „ултразвучног“ стања протеина које се разликује од стања протеина изазваних топлотним, механичким ефектима или ефектом растварања.<sup>272</sup> Прегледом доступне литературе скоро и да нема података о изоловању пептидних фракција из хидролизата протеина беланцета и њиховом масеном уделу, за разлику од хидролизата других протеина биљног и животињског порекла. Наиме, две групе истраживача користили су процес ултрафилтрације са мембраном од 30 kDa<sup>309</sup> и 3 kDa<sup>63</sup> како би хидролизате протеина беланцета одвојили на пермеат и ретентат, па добијене пермеате користили у различитим хроматографским системима за финалија изоловање пептида и одређивање њихове секвенце. Код друге две групе аутора<sup>310-311</sup> који су секвенционално користили

мембране од 30, 10 и 1 kDa у процесу ултрафилтрације хидролизата протеина беланцета, резултати о масеном уделу пептида појединачних изолованих фракција су изостали иако су урађене детаљне анализе биолошких активности. Због тога је резултате овог израживања са аспекта удела изолованих пептидних фракција протеина беланцета било тешко поредити са доступним литературним резултатима.

Генерално, приказни резултати истичу у први план ултрафилтрацију као погодну сепарациону технику за раздвајање сложене смеше хидролизата, а на основу саме расподеле молекулских маса пептида очигледна је разлика међу хидролизатима различито претретираних протеина. Како је за ширу комерцијалну примену биолошки активних пептидних фракција било инкорпорирањем у дијететске и/или фармацеутске суплементе, или нутрицеутике неопходно да поседују што мању молекулску масу замена конвенционалног термичког претретмана иновативном и мање инвазивном технологијом ултразвука са погледом на остварени удео пептидних фракција је оправдана.

#### **7.4. АНТИОКСИДАТИВНА АКТИВНОСТ ИЗЛОВЕНИХ ФРАКЦИЈА ПЕПТИДА ИЗ НАТИВНИХ ПРОТЕИНА БЕЛАНЦЕТА**

Познато је да изоловане протеинске фракције беланцета (нпр. овоотрансферин, овалбумин и овомукоид) и/или њихови хидролизати поседују значајан број биолошких активности попут антиоксидативне, антихипертензивне, антикоагулационе, антипролиферативне, али још увек није изолован и идентификован довољан број биоактивних пептида, а поседују истовремено две или више биолошке активности. Стога, веома је интересантно проучити синергизам биолошких активности хидролизата нативних протеина беланцета и њихових изолованих пептида. Проучавањем синергистичког ефекта одговарајућих биолошких својстава у оквиру овог истраживања даће се допринос у разумевању механизма деловања биоактивних пептида, као и проналажењу корелације дужина и секвенца пептида и њихове биолошке функције. Корелација између структуре пептида и биолошке функције протеинских хидролизата и/или изолованих фракција пептида није потпуно позната, али се сматра да зависи од неколико карактеристика: секвенце аминокиселина, молекулске масе пептида, хидрофобности, наелектрисања и својства основних аминокиселина.<sup>312-313</sup>

Следствено наведеном, изоловане фракције пептида из хидролизата нативних протеина беланцета сакупљене су и извршена је њихова карактеризација са аспекта различитих биолошких својстава. Најпре су изоловане фракције пептида окарактерисане одређивањем и поређењем антиоксидативне активности сваке од њих, јер је прегледом литературних резултата закључено да фракције пептида различитих молекулских маса поседују значајно другачије антиоксидативне способности. Интересантно је и запажање да су у појединим радовима ултрафилтрационе фракције пептида имале значајно ниже вредности антиоксидативне активности изражене преко редукујуће моћи у поређењу са полазним хидролизатима, што су истраживачи објаснили као резултат разблажења хидролизата ултрафилтрацијом.<sup>310, 314-315</sup> Антиоксидативна активност испитана је спектрофотометријским мерењем способности фракција пептида да:

- ❖ редукују 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) радикалски катјон (ABTS<sup>•+</sup>),
- ❖ инхибирају оксидацију  $\alpha$ -дезоксирибозе (тзв. метода неутрализације хидроксилног радикала,  $\cdot\text{OH}$ ) и оксидацију пирогалола (тзв. метода неутрализације супероксид радикала,  $\text{O}_2\cdot$ )
- ❖ хелирају металне јоне (јоне гвожђа),
- ❖ инхибирају липидну пероксидацију на моделу пероксидације линолне киселине и
- ❖ инхибирају липидну пероксидацију на моделу пероксидације емулзије  $\beta$ -каротен–линолна киселина.

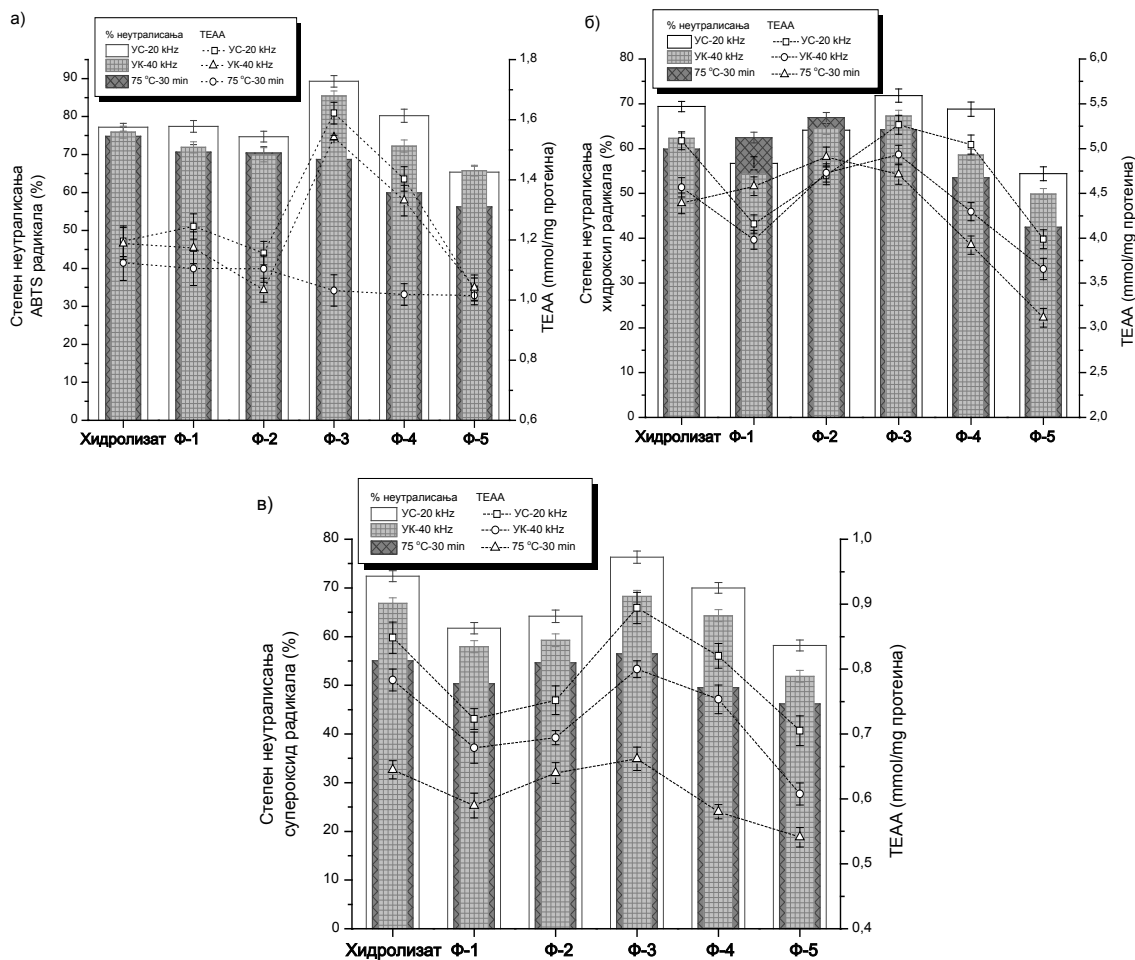
#### **7.4.1. Утицај састава и величине пептида на способност инхибиције реактивних кисеоничних врста и слободних радикала**

Услед различитости механизма деловања на реактивне врсте кисеоника, добијене вредности антиоксидативних активности хидролизата и изолованих фракција пептида изражене преко степена инхибиције или преко количине еквивалента стандардних комерцијалних антиоксиданата (Тролокс еквивалент антиоксидативне активности, *на енгл.* trolox equivalent antioxidant activity – ТЕАА) упоређене су међусобно, али и са комерцијалним синтетичким антиоксидативним средствима. Резултати инхибиције реактивних врста кисеоника и слободних радикалских група илустровани су на Слици 7.18.

Антиоксидативна активност одређена преко степена неутралисања односно инхибиције ABTS<sup>•+</sup> радикаског катјона означава способност изолованих фракција пептида протеина беланцета да реагују као донори електрона или водоника у реакцијама слободних радикала. Код ове методе, зелено-плава хромофора стабилног радикаског катјона ABTS<sup>•+</sup> редукује се у присуству оних једињења који могу бити донори електрона или водоника и настаје једноелектронски оксидисан производ антиоксиданта. Реакција је праћена обезбојавањем, а у зависности од структуре насталог производа могућа је његова димеризација или реакција са још једним молекулом ABTS<sup>•+</sup> радикаског катјона. У првобитним тестовима, метмиоглобин је у реакцији са водоник-пероксидом формирао фермиоглобин радикал, који је затим у реакцији са ABTS образовао ABTS<sup>•+</sup> радикалски катјон. После тога, за генерисање овог радикаског катјона коришћене су најразличитије методе које су подразумевале реакције са манган-диоксидом, 2,2'-азинобис-2-амидинопропан дихидрохлоридом, калујум-персулфатом, ензимску реакцију са пероксидазом из рена и реакције електрохемијске оксидације, а времена одигравања реакције са антиоксидансом варираше су од 1 до 30 минута. Генерално, без обзира на горе наведено, количина преосталог ABTS<sup>•+</sup> радикаског катјона након реакције са антиоксидантом у узорку мери се након одређеног времена. ABTS<sup>•+</sup> радикалски катјон раствара се у води и у органским растварачима што омогућава да се на једноставан и поуздан начин одреди антиоксидативни капацитет како хидрофилних, тако и липофилних јединица. Међутим, недостатак ове методе огледа се у чињеници да се једињење ABTS не налази природно у биолошким системима, па се она сматра недовољно релевантном за дефинисање биолошке функције.<sup>316</sup> Из тог разлога, антиоксидативна активност фракција пептида тестирана је различитим методама.

Утицај ултразвучног и термичког претретмана, као и расподела молекулских маса ултрафилтративних фракција пептида са аспекта степена неутрализације изражен као проценат инхибиције ABTS<sup>•+</sup> радикаског катјона, испитан је и приказан на Слици 7.18а. Технологијом ултразвука високог интензитета, применом различитих врста уређаја за соникацију, фреквенци 20±0,2 и 40±2 kHz, антиоксидативна активност добијених хидролизата значајно је побољшана ( $p < 0,05$ ) са вредности инхибиције негативне контроле која је износила 7,69±0,69% до 77,17±1,03 и 75,89±1,46%, редом. Ултрафилтративним фракционисањем хидролизата ултразвучно претретираних протеина изловане су фракције пептида са

високим вредностима антиоксидативне активности, значајно већим ( $p < 0,05$ ) код фракција пептида молекулске масе 3-10 kDa и 1-3 kDa, фракције-3 и фракције-4, редом.



**Слика 7.18.** Утицај профила изолованих фракција пептида са аспекта њихове молекулске масе и прехидролитичког третмана на антиоксидативну активност изражену преко степена неутралисања: а) ABTS радикала, б) хидроксил радикала и в) супероксид анјона. Вредност степена неутралисања супероксид анјона за глутатион, позитивну контролу, износила је  $98,12 \pm 1,01\%$ . Негативна контрола била је водени 10% раствор нетретираниог нативног беланцета чије су вредности антиоксидативних активности износиле: а)  $7,69 \pm 0,69\%$  и  $0,12 \pm 0,02$  TEAA  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  протеина, б)  $20,25 \pm 1,56\%$  и  $1,48 \pm 0,16$  TEAA  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  протеина, в)  $4,39 \pm 0,30\%$  и  $0,05 \pm 0,008$  TEAA  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  протеина.

Међу свим изолованим фракцијама, највиша вредност инхибиције ABTS<sup>+</sup> радикалског катјона забележена је у фракцији пептида молекулске масе 3-10 kDa, изоловане из хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом, са вредношћу  $89,29 \pm 1,52\%$ . Реч је о третману ултразвучном сондом који је и у

досадашњим резултатима дао најзначајније резултате унапређења процеса ензимске хидролизе како са аспекта удела хидролизованга пептидних веза у молекулу беланцета, а последично и јединственог састава пептида, тако и са аспекта структурних промена. Насупрот томе, вредности степена инхибиције АВТS<sup>+</sup> радикаског катјона пептидних фракција молекулских маса 3-10 и 1-3 kDa добијених ултрафилтрацијом хидролизата термички претретираних протеина знатно су ниже од вредности хидролизата ( $74,78 \pm 1,46\%$ ) и износе  $68,71 \pm 1,32$  и  $59,94 \pm 1,12\%$ , редом. Објашњење ових приказаних резултата лежи у чињеници да антиоксидативна активноси зависи од аминокиселинског састава, као и да се велики број аминокиселинских остатака са антиоксидативним капацитетом налази у унутрашњости пептидних молекула, а да је њихово деловање ограничено услед заклоњености деловима ланца полипептида молекулских маса већих од 3 kDa. Претретман протеина ултразвучним таласима високог интензитета може се користити за повећање изложености ових аминокиселинских остатака из унутрашњости молекула протеина услед конформационих промена које подразумевају потпуно или делимично одмотавање полипептидних ланаца. Ово доводи до веће изложености аминокиселина које су носиоци антиоксидативне активност растварачу и ензимској хидролизи, а последично до повећања укупне антиоксидативне активности. Супротно, термички претретман може проузроковати иреверзибилну денатурацију протеина и формирање агрегата, услед чега се биолошка функција аминокиселина које су носиоци активности смањује.<sup>152</sup> Приказани резултати степена неутралисања АВТS радикала у опсегу 65 до 89% ултрафилтрационих фракција пептида из протеина беланцета слични су литературним вредностима пептидних фракција протеина беланцета добијених ултрафилтрационим раздвајањем на три фракције. Наиме, хидролизат беланцета добијен алкалазом фракционисан је на три фракције коришћењем мембрана величине пора 30, 10 и 1 kDa, а антиоксидативне активности изражене преко степена инхибиције АВТS радикала биле су у опсегу 85 до 96%.<sup>317</sup> Неопходно је нагласити да је наведен опсег литературних вредности антиоксидативне активности остварен при концентрацији пептида  $5 \text{ mg/cm}^3$ , док су скоро идентични резултати, нарочито за фракције пептида мање од 10 kDa, у овој дисертацији остварени при четири пута мањој концентрацији пептида у свим фракцијама ( $1,2 \text{ mg/cm}^3$ ).



Увидом у резултате антиоксидативне активности изражене као ТЕАА вредност, очигледно је да међу фракцијама пептида хидролизата са термичким претретманом није било значајних разлика ( $p < 0,05$ ). Насупрот томе, за фракције пептида молекулске масе 3-10 и 1-3 kDa, ултразвучно претретитаних протеина, антиоксидативне активности приказане као ТЕАА вредности су 2 и 1,4 пута веће у поређењу са вредношћу која одговара фракцији богатој пептидима молекулских маса мањих од 1 kDa. Нарочито висока вредност Тролокс еквивалената антиоксидативне активности показала је фракција-3 изолована из хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом и износила је  $1,62 \pm 0,04 \mu\text{mol}/\text{mg}$  протеина. Наведена ТЕАА вредност фракције-3 у складу је са ТЕАА вредношћу ( $1,69 \mu\text{mol}/\text{mg}$  протеина) пептида изолованих из лизозима беланцета.<sup>209</sup> Као резултат фракционисања сва три хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвучним таласима фреквенце  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz и термички, свеукупно изводи се податак да су фракције-3 са пептидима молекулске масе 3-10 kDa показале значајно ниже  $\text{IC}_{50}$  вредности ( $0,91$ ,  $1,12$  и  $1,65 \text{ mg}/\text{cm}^3$ , редом), а самим тим јачи потенцијал редуковања  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  радикалског катјона у поређењу са фракцијама које садрже пептиде већих и мањих молекулских маса.  $\text{IC}_{50}$  вредност представља концентрацију антиоксиданса која је потребна за постизање половине максималне инхибиторне активности и у овом случају мера је ефективности фракције пептида у инхибирању специфичног  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  радикалског катјона. Са термодинамичког аспекта, једињења са потенцијалном антиоксидативном активношћу могу редуковати  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  уколико је вредност њиховог редокс потенцијала мања од вредности стабилног  $\text{ABTS}$  ( $680 \text{ mV}$ ).<sup>318</sup>

Будући да тзв. хватање слободних радикала (*на енгл.* free radical scavenging) представља основни механизам деловања протеинских антиоксиданаса у инхибирању оксидативних процеса, за који су типичне реакције са  $\text{DPPH}^{\cdot}$  радикалом и  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  радикал катјоном, хидролизати протеина беланцета и изоловане ултрафилтрационе фракције пептида подвргнути су реакцији са хидроксил радикалом ( $\cdot\text{OH}$ ). Са **хидроксил радикалом** насталим у Фентоновој реакцији ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ ),<sup>319</sup> испитани узорци пептида реаговали су као доноси електрона инхибирајући оксидацију  $\alpha$ -дезоксирибозе, а резултати неутрализације хидроксил радикала приказани су на Слици 7.18б. Ова једноставна метода заснива се на редукацији водоник-пероксида до хидроксил радикала и хидроксилног анјона у присуству  $\text{Fe}^{2+}$ -

EDTA комплекса, а настали хидроксилни радикал везује молекул  $\alpha$ -дезоксирибозе уз образовање смеше различитих производа дезоксирибозе и маландиалдехида (Слика 7.14). По предложеном механизму, у фази иницијације се напад хидроксил радикала на 2-дезоксирибозу одвија у положају 4, а настали радикал у фази пропације реагује са кисеоником из ваздуха уз издавање хидропероксида дезоксирибозе. Овај производ је стабилан извесно време на собној температури, али се на благо повишеној температури и у киселој средини, преводи у рибокси радикал. Фаза терминације започиње отварањем прстена на положају 4, поновно образовање хидроксил радикала и маландиалдехида. По додатку тиобарбитурне киселине, на ниској температури и у киселој средини, гради се хромоген, продукт тиобарбитурне киселине и маландиалдехида, интензивно розе боје. Додатком пептида као антиоксиданата након оксидације гвожђа до  $Fe^{3+}$ , редукцијом фери јона спречава се настанак хидроксил радикала.<sup>320</sup>

Додатно, међу свим реактивним кисеоничним врстама, хидроксил радикал је најреактивнија врста и може се формирати из супероксид анјона и водоникпероксида у присуству металних јона као што су јони бакра или гвожђа. Овакав, хидроксилни радикал може озбиљно оштетити биомолекуле као што су сви протеини, ДНК, полинезасићене масне киселине, нуклеинске киселине и готово све биолошке молекуле са којима долази у додир. Настала оштећења биомолекула настала услед деловања хидроксила радикала могу довести до превременог старења, развоја канцерогених ћелија и неких болести. Отуда је уклањање хидроксил радикала један од најефикаснијих одбрамбених система ћелија против различитих болести.<sup>321</sup>

Као што је приказано на Слици 7.18б, међу пет фракција пептида различитих опсега молекулских маса, фракција-2 (10-30 kDa) и фракција-3 (3-10 kDa) изоловане из три различита хидролизата протеина беланцета биле су ефикасније у редукцији фери јона, а последично и спречавању настанка хидроксил радикала. Прецизније, хидролизат протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz 15 минута и његове ултрафилтриране фракције, и то фракција-2 и фракција-3, испољили су знатно веће антиоксидативне активности са аспекта неутралисања хидроксил радикала у поређењу са осталим узорцима пептида, а добијене вредности износиле су  $69,38 \pm 1,12$ ,  $64,12 \pm 1,56$ ,  $71,80 \pm 1,47\%$ , редом. Резултати су још једном указали на то да су соницирање ултразвучном сондом и накнадна хидролиза алкалазом довели до најизражајних промена у структури

протеина беланцета и да су том приликом ослобођени пептиди способни за инхибирање  $\cdot\text{OH}$  радикала. Наведени резултати у сагласности су са литературним подацима који у први план стављају пептидне фракције обележене од стране аутора као F4 и F8, изоловане из хидролизата протеина беланцета нојевог јајета, а које су показале изразиту способност инхибирања  $\cdot\text{OH}$  радикала са степенима неутрализације 68,8 и 64,3%, редом.<sup>322</sup> Фракције са пептидима најмањих молекулских маса ( $<1$  kDa), изоловане из сва три припремљена хидролизата протеина беланцета, од свих осталих фракција, али и полазног хидролизата, биле су значајно мање ефикасне у неутрализацији хидроксил радикала ( $p < 0,05$ ). Сходно овом резултату, чини се да и величина пептида и састав фракција пептида играју значајну улогу у способности инхибирања  $\cdot\text{OH}$  радикала, али и да фракција пептида молекулске масе 3-10 kDa показује веће вредности неутралисања радикала него фракције са пептидима молекулских маса 1-3 kDa и  $<1$  kDa. Већа вредност антиоксидативне активности са аспекта неутралисања  $\cdot\text{OH}$  радикала забележена је код фракција пептида већих молекулских маса у поређењу са фракцијама пептида мањих од 3 kDa, изолованих из хидролизата биљних протеина грашка (*на енгл. bambara groundnut Vigna subterranea*).<sup>323</sup> Додатним увидом у резултате антиоксидативне активности разматрајући вредности концентрација пептида потребних за половину максималне инхибиторне активности, евидентно је да је фракција-3 изолована из хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом показала нешто нижу активност ( $\text{IC}_{50}$  концентрација =  $0,82 \pm 0,08$  mg/cm<sup>3</sup>) него што је синтетски антиоксидант Тролокс ( $\text{IC}_{50}$  концентрација =  $0,64 \pm 0,06$  mg/cm<sup>3</sup>), али је такође испољила далеко већу ефикасност од синтетичког бутилхидрокситолуена ( $\text{IC}_{50}$  концентрација =  $3,24 \pm 0,11$  mg/cm<sup>3</sup>). Супротно резултатима ове дисертације, из протеина беланцета хидролизом са пепсином издвојени су узорци, хидролизат и пептидна фракција, сваки у концентрацији 1 mg/cm<sup>3</sup> са вредностима степена неутрализације хидроксил радикала од 55,97 и 66,13%, редом, док су концентрације неопходне за постизање половине максималне инхибиције ( $\text{IC}_{50}$  вредности) биле 0,40 и 0,22 mg/cm<sup>3</sup>, редом.<sup>324</sup> Литературно више вредности концентрација неопходних за постизање половине максималне инхибиције хидроксил радикала могу се приписати разликама у специфичности деловања пепсина из литературних података и алкалазе из ове дисертације, а самим тим и разликама у типу формираних пептидних фрагмената и аминокиселина на крају хидролизе. Истраживачи су високу

антиоксидативну активност фракције пептида добијене ултрафилтрацијом хидролизата протеина семена афричког јага (*Sphenostylis stenocarpa*) мањих од 1 kDa повезали са високим вредностима укупних хидрофобних (Ala, Val, Ile, Leu, Tyr, Phe, Trp, Pro, Met и Cys) и ароматичних аминокиселина позивајући се на литературне податке да ароматичне аминокиселине (Trp, Tyr и Phe) веома лако реагују са слободним радикалима као доноси електрона и да истовремено одржавају своју структурну стабилност преко резонантних структура, док аминокиселине са имидазолном, индолном или фенолном групом (His, Trp, Tyr) делују као доноси водоника, а таква активност приписују се групама које се налазе у њиховом бочном ланцу.<sup>5</sup>

У биолошким системима **супероксид анјони** могу се образовати током каталитичких реакција ензима или оксидације хемоглобина, а користе се за процену супресије њиховог деловања од стране потенцијалних антиоксиданата.<sup>325</sup> Иако супероксид радикали не иницирају липидну оксидацију директно, они могу поспешити оксидативне реакције због своје способности да редукују прелазне метале, ослобађају метале везане за протеине и формирају перхидроксил радикале који иницирају липидну оксидацију.<sup>326</sup> За заштиту ћелија од ове групе реактивног кисеоника, супероксид-дисмутаза која катализује неутрализацију супероксид анјона на водоник-пероксид, један је од главних одбрамбених механизма живих ћелија. Не само супероксид анјонски радикал већ и његови деривати изазивају ћелијско општећење које може довести до општећења ДНК и градивних липида ћелијских мембрана. Стога, од великог је значаја инхибирање и супресија деловања супероксид анјон радикала.<sup>321</sup> У овом истраживању, супероксид анјони генерисани су оксидацијом пирогалола, а антиоксидативна активност са аспекта неутралисања супероксид анјон радикала изражена је као инхибиција аутооксидације пирогалола. У зависности од примењеног претретмана, хидролизати протеина беланцета и изоловане пептидне фракције испољили су различите вредности степена неутралисања супероксид анјона ( $O_2^{\cdot-}$ ) и Тролокс еквивалената, а резултати су приказани на Слици 7.18в.

На основу приказаних резултата са Слике 2.18в, евидентно је да фракције-3, молекулске масе пептида у опсегу 3-10 kDa, изоловане из хидролизата различито претретираних протеина беланцета, имају значајно веће ( $p < 0,05$ ) вредности степена неутрализације супероксид анјона у поређењу са полазним узорцима хидролизата. Пептиди молекулске масе мање од 1 kDa, садржани у фракцијама-5, испољили су

способност супресије  $O_2^{\bullet-}$  анјона са вредностима степена неутралисања мањим од 60%, при чему је ова вредност најнижа за ултрафилтрациону фракцију хидролизата протеина беланцета претретираних термички ( $46,18 \pm 1,47\%$ ). Већ прва запажања у складу су са литературним подацима који истичу да пептиди већих молекулских маса поседују знатно већу способност неутралисања супероксида анјона за разлику од пептида мањих молекулских маса, при чему су генерално све испитане фракције пептида изоловане из хидролизата биљних протеина грашка слаби инхибитори овог реактивног анјона са вредностима степена инхибиције ( $<20\%$ ), чак два пута мањим од резултата приказаним у оквиру ове дисертације.<sup>323</sup> Имајући у виду утицај врсте претретмана на састав и величину изолованих пептидних фракција и утицај на способност инхибиције  $O_2^{\bullet-}$  анјона, јасно је да пептидне фракције изоловане из хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом поседују већи потенцијал инхибирања у односу на претретман у ултразвучном купатилу и на високој температури. Важно је истаћи да су, из протеина претретираних ултразвучном сондом и хидролизованых алкалазом, изоловане фракције пептида молекулских маса 3-10 и 1-3 kDa, при концентрацији  $1 \text{ mg/cm}^3$ , показале способност неутралисања  $O_2^{\bullet-}$  анјона са вредностима степена неутрализације у опсегу 70-76%. Осим што се фракција-3 из хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом показала као најефективнија за супресију  $O_2^{\bullet-}$  анјона са концентрацијом неопходном за половину максималне инхибиције од  $0,65 \pm 0,09 \text{ mg/cm}^3$ , она је била и далеко супериорнија од синтетских антиоксиданата Тролокса ( $1,04 \pm 0,06 \text{ mg/cm}^3$ ) и бутилхидрокситолуена ( $2,18 \pm 0,07 \text{ mg/cm}^3$ ). Резултати са Сlike 7.18в недвосмислено показују да ултрафилтрационе фракције опсега масе 3-10 kDa, поготову фракција из узорка са претретманом изведеним ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2 \text{ kHz}$ , могу садржати пептиде који делују као доноси електрона или водоника и реагују са супероксид анјоном инхибирајући оксидацију истог.

Наведени резултати овог истраживања знатно су виши од литературних вредности добијених за протеине беланцета нојевог јајета хидролизоване пепсином. Наиме, хидролизат беланцета припремљен пепсином и изоловани пептид означен као DG-10 са секвенцом DAESLSRLLG, оба при концентрацијама  $1 \text{ mg/cm}^3$ , испољили су за чак 10% ниже вредности (66,12 и 61,29%, редом).<sup>324</sup> Други литературни резултати указују на то да хидролизат протеина семена афричког јага (*Sphenostylis stenocarpa*) и његове мембранске фракције пептида, при концентрацији 1

mg/cm<sup>3</sup>, показују умерену активност супресије супероксид радикала, при чеми фракције пептида молекулске масе мање од 3 kDa показују статистички значајно највишу ( $p < 0,05$ ) вредност степена инхибиције од 43%, а најмању хидролизат (31,3%).<sup>5</sup> Слично резултатима ове дисертације, висока вредност инхибиције O<sub>2</sub><sup>-</sup> анјона од 69,15% присутна је у фракцији названој Fra.IV, а изолованој гел-филтрационом хроматографијом хидролизата протеина леблебије, при концентрацији 2 mg/cm<sup>3</sup>.<sup>259</sup> Група истраживача претпоставља да су хидрофобне (Leu, Val и Ala) и ароматичне аминокиселине присутне у хидролизатима протеина беланцета допринеле инхибицији слободних радикала, док аминокиселине His, Glu, Leu и Tyr побољшавају капацитет инхибирања слободних радикала антиоксидативних пептида донирањем атома водоника.<sup>97</sup> Додатно, Ли (Li) и коаутори су утврдили да пептидна фракција мале молекулске масе (0,2-3 kDa) из хидролизата протеина леблебије, са високом вредношћу степена инхибиције супероксид анјона, садржи у високој концентрацији аминокиселине Phe, Ile, Leu и Val у поређењу са осталим фракцијама. Стога су предложили као закључак да способност неутралисања супероксид анјона је блиско повезана са садржајем хидрофобних аминокиселина.<sup>259</sup>

Поређењем способности инхибиције ABTS<sup>+</sup> радикал катјона и хидроксил радикала са способношћу инхибиције супероксид анјона, фракција-3 из узорка са претретманом изведеним ултразвучном сондом фрекценце 20±0,2 kHz испољила је ефективнији инхибиторни утицај на ABTS<sup>+</sup> радикал катјон и хидроксил радикал ( $p < 0,05$ ). Такође, резултати указују и на то да пептиди протеина беланцета ипак нису толико ефикасни као глутатион (98,12±1,01%) за супресију општећења на нивоу ћелија проузрокованих супероксид анјоном. Зато, зависно од степена инхибиције супероксид радикала, ултрафилтрационе фракције из узорка са претретманом изведеним ултразвучном сондом могу обезбедити одређен ниво заштите ћелија од токсичног деловања слободних супероксид радикала.

Свеукупно, може се истаћи да **фракције пептида протеина беланцета, молекулских маса 3-10 и 1-3 kDa, изоловане из хидролизата протеина беланцета соницираних ултразвучном сондом, поседују изузетне способности супресије слободних радикалских група као што су ABTS<sup>+</sup> радикалски катјон, хидроксил радикал и супероксид анјон радикал.** С обзиром на наведено, претпоставља се да ове фракције поседују висок садржај поларних, ароматичних и хидрофобних аминокиселина, али и да постоји корелација између садржаја аминокиселина и

величине пептида са способношћу инхибирања слободних радикала. О овоме ће бити речи у даљој фази истраживања, пре свега одређивањем укупне површинске хидрофобности пептидних фракција (потпоглавље 7.8).

#### 7.4.2. Утицај састава и величине пептида на способност инхибиције липидне пероксидације

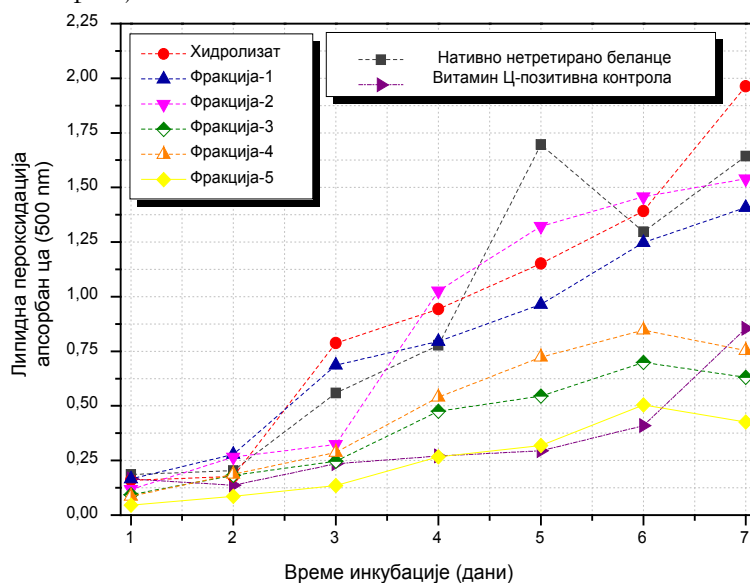
Како су се у претходним *in vitro* тестовима антиоксидативне активности са великом значајношћу издвојили узорци протеина беланцета претретирани ултразвучном сондом  $20 \pm 0,2$  kHz, хидролизат међу хидролизатима, али и фракције пептида међу свим фракцијама, антиоксидативна активност је у даљој фази истраживања верификована одређивањем утицаја састава и величине пептида на способност инхибиције липидне пероксидације. Практично, пероксидација липида може проузроковати штетне ефекете у прехранбеним производима и живим ћелијама формирањем сложених смеша секундарних производа разградње липидних пероксида. Унос овакве хране може узроковати низ различитих штетних ефеката, укључујући пре свега токсичност за ћелије сисара.<sup>259</sup> Отуда, инхибиција липидне пероксидације представља основни механизам деловања антиоксиданата као дијететских формулација. Инхибиција липидне пероксидације хидролизата протеина беланцета и изолованих пептидних фракција испитана је на:

- ❖ моделу пероксидације линолне киселине (Слика 7.19) и
- ❖ моделу пероксидације емулзије  $\beta$ -каротен–линолна киселина (Слика 7.20).

Метода са моделом пероксидације линолне киселине заснива се на иницирању аутооксидације масних киселина на повишеној температури где се у првој фази формира липидни радикал који у фази пропације реагује са кисеоником из ваздуха и гради липидни пероксидни радикал. **Липидни пероксидни радикал** у фази терминације реагује са преосталом количином масне киселине уз формирање липидног пероксида. У следећој реакцији редукције липидног пероксида са  $\text{Fe}^{2+}$  настају липидни алкокси радикал и хидроксилни анјон, као и  $\text{Fe}^{3+}$  јон који са тиоцијанатом гради интензивно црвени комплекс. Инхибиција овог процеса антиоксидантом се дешава након иницијације, односно по настанку липидног радикала, где антиоксидант предаје свој протон радикалу и настаје масна киселина. На тај начин спречава се фаза пропације и липидна пероксидација (Слика 6.16).<sup>211,</sup>

<sup>327-329</sup> Интензитет апсорпције насталог крајњег црвеног комплекса директно је

пропорционалан степену оксидације линолне киселине. Оксидација линолне киселине очигледно је инхибирана додавањем хидролизата и његових пептидних фракција као што је приказано на Слици 7.19, а проценат инхибиције оксидације упоређен је се комерцијалним синтетским антиоксидантом витамином Ц.



**Слика 7.19.** Утицај састава и величине пептида изолованих из хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом ( $20 \pm 0,2$  kHz) на липидну пероксидацију у модел систему емулзије са линолном киселином. Оксидација линолне киселине приказана је преко промене апсорбанце производа реакције мерене на таласној дужини 500 nm.

Евидентно је из приказаних резултата (Слика 7.19) да су међу фракцијама протеина беланцета, изоловани пептиди молекулске масе 3-10, 1-3 и < 1 kDa током периода инкубације од 7 дана показали изразиту способност инхибирања оксидације линолне киселине, уз занемарљиво формирање пероксида у току петог и шестог дана инкубације, а укупна средња вредност инхибиције износила је 75,5%. Ефекат инхибиције фракцијом-5 (< 1 kDa) био је најближи инхибицији линолне киселине аскорбинском киселином, која је испољила високу активност пероксидације са вредношћу од 78,0% у поређењу са вредношћу нативног нетретираног беланцета након седам дана (18,32%). Код узорка нетретираних протеина током првих пет дана уочава се повећање апсорбанце, након чега апсорбанца постепено опада, али су вредности и даље значајно више него претходно поменуте три фракције пептида. Овакав ток резултата може се приписати нестабилности водоник-пероксида и деградацији неких секундарних производа оксидације што је довело до смањења апсорбанце након продужене инкубације од шест и седам дана. Генерално, изоловане пептидне фракције протеина беланцета претретитане ултразвучном



сондом биле су врло ефикасни инхибитори са процентом инхибиције већим од 60% у току прва 3 дана, изузев фракције са пептидима молекулске масе веће од 30 kDa, показујући да су у могућности да редукују пероксидни радикал на молекуле хидропероксида. Пероксидативна активност хидролизата протеина претретираних ултразвучном сондом, изолованих пептидних фракција молекулске масе веће од 30 kDa и у опсегу 10-30 kDa смањује се током инкубације. За разлику од наведених фракција, фракција-5 била је стабилнија током времена. Група аутора је у свом истраживању утврдила да је фракција са пептидима најмање молекулске масе (мањим од 1 kDa), добијена ултрафилтрацијом хидролизата мишићних протеина јегуље, испољила највећу активност пероксидације од 79% у идентичном модел систему као у овој дисертацији.<sup>330</sup> Изоловане фракције пептида из хидролизата протеина обезмашћених пиринчаних мекиња испољиле су високу активност инхибиције липидне оксидације током 12 дана инкубације (55-62%), нарочито фракција са највећом укупном хидрофобношћу означена као HSDRBH-75. Ова група аутора известила је да се услед велике хидрофобности може повећати присуство пептида на граници фаза воде и липида, чиме је олакшан приступ пептидима за тзв. „хватање“ хидрофобних радикалских врста или слободних радикала насталих у липидним реакцијама.<sup>331</sup>

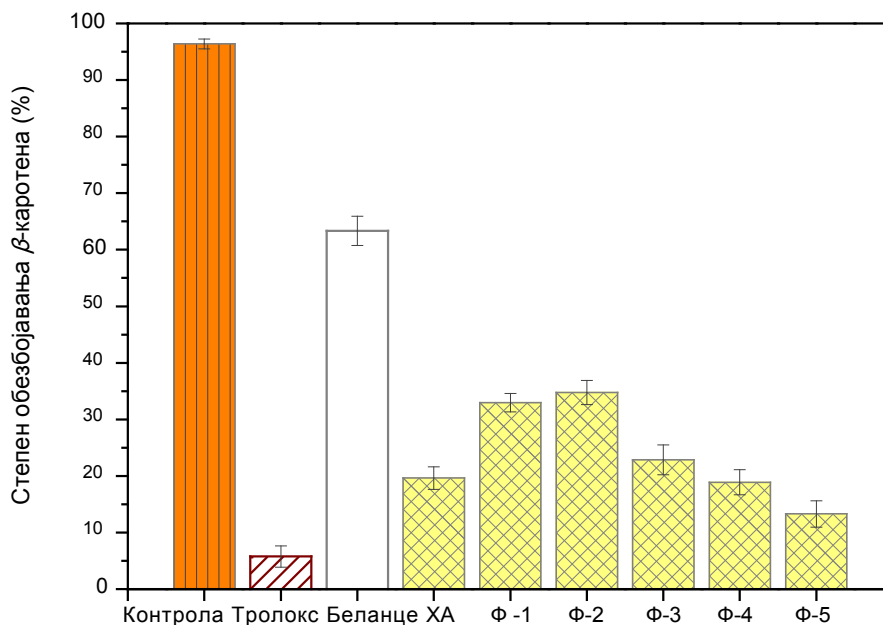
Додатно, током прва два дана инкубације није забележена разлика ( $p > 0,05$ ) са аспекта инхибиције липидне оксидације међу узорцима хидролизата и ултрафилтрационих фракција пептида. Вредности процента инхибиције липидне оксидације седмог дана инкубације при концентрацији пептида  $1,2 \text{ mg/cm}^3$  за узорке хидролизата, фракције-1, фракције-2, фракције-3, фракције-4, фракције-5 износиле су 23,78, 28,52, 32,62, 75,26, 71,08 и 80,15%, редом. Наведене вредности знатно су веће у поређењу са негативном контролом, нетретираним нативним беланцем при концентрацији протеина  $10 \text{ mg/cm}^3$ . Резултати ове дисертације указују да су пептидне фракције и хидролизат протеина беланцета при концентрацијама  $1,3 \text{ mg/cm}^3$  добри инхибитори пероксил радикала, пре него што могу учествовати у иницијацији реакције оксидације, у поређењу са хидролизатима кикирикијевих протеина који су показали активност пероксидације при значајно већим концентрацијама.<sup>332</sup> За разлику од ових литературних резултата, друга група истраживача је известила да је хидролизат протеина беланцета припремљен папаином са концентрацијом протеина  $4 \text{ mg/cm}^3$  испољио високу активност

инхибиције липидне пероксидације у вредности 73,72% седмог дана инкубације и претпоставили су да хидрофобне аминокиселине присутне у овом хидролизату доприносе активности услед повећања растворљивости пептида у липидима.<sup>97</sup>

Дискутовани резултати са Слика 7.19 указују на то да хидролизат протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом, нарочито изоловане фракције пептида малих молекулских маса, испољавају значајан антиоксидативни капацитет за тзв. „хватање“ атома водоника са угљеника метиленске групе у полинезасићеним масним киселинама и тако инхибирају пероксидацију масних киселина. Сходно наведеном, претпоставља се да хидрофобност аминокиселина које чине секвенцу пептида може довести до нових интеракција између пептида и линолне киселине, резултирајући заштитним ефектом ове полинезасићене масне киселине од оксидације, а уједно и омогућавајући бољу интеракцију са врстама слободних радикала. Такође, висока активност инхибиције липидне пероксидације може се повезати са активношћу пептида да хелирају металне јоне, због чега ће се у наредној фази баш овај хидролизат и његове изоловане фракције тестирати на способност хелирања јона гвожђа (одељак 7.4.3).

Прехрамбени производи углавном представљају вишефазне системе у којима липиди и вода чине стабилан систем углавном уз присуство емулгатора, па је сходно томе неопходно антиоксидативну активност потенцијалних антиоксиданата испитати и у хетерогеним системима као што су емулзије. Процес пероксидације незасићених масних киселина у воденом систему индукован високом температуром праћен је и на моделу емулзије  $\beta$ -каротена-линолне киселине методом праћења **оксидативне деградације  $\beta$ -каротена** у циљу сагледавања укупне биолошке активности пептида протеина беланцета. У циљу минимизирања нежељених реакција које би могле дати погрешне резултате у овом тесту, одабрана температура реакције у току инкубације није била већа од 50 ° C. До оксидације  $\beta$ -каротена долази током реакције са слободним радикалима карактеристичним за липидну оксидацију (нпр. пероксил радикали), услед чега се нарушава структура  $\beta$ -каротена, двогубе везе се раскидају и раствор  $\beta$ -каротена се обезбојава. Додатком антиоксиданата у реакциони систем, донора атома водоника пероксил радикалу, спречава се губитак водоника из диалилних метиленских група линолне киселине, индиректно спречавајући оксидацију  $\beta$ -каротена уз формирање антиоксидативног радикала и липидних деривата.<sup>333</sup> Добијени резултати процента обезбојавања  $\beta$ -каротена, односно степена

неутралисања пероксил радикала у овом случају представљени су на Слици 7.20 и потврдили су претходне изузетно добре резултате активности пептида протеина беланцета у инхибицији липидне оксидације неутралисањем хидропероксил радикала на модел систему линолне киселине (Слика 7.19).



**Слика 7.20.** Степен обезбојавања  $\beta$ -каротена у систему липидне емулзије  $\beta$ -каротен-линолна киселина у присуству пептида различитог састава и величине изолованих из хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом ( $20 \pm 0,2$  kHz). *Легенда:* ХА-хидролизат протеина беланцета припремљен алкалазом, Ф-1 до Ф-5 су фракције пептида изоловане из хидролизата.

Добијени резултати показују да су сви испитани узорци како хидролизата протеина беланцета, тако и изоловане пептидне фракције додати у липидну емулзију  $\beta$ -каротен-линолна киселина били изузетно способни да инхибирају формирање пероксил радикала током 120 минута инкубације у поређењу са контролним узорком нативног нетретираног беланцета, чиме је структура  $\beta$ -каротена остала очувана, оксидација  $\beta$ -каротена која се манифестује обезбојавањем реакционе смеше је инхибирана. Фракције пептида молекулске масе мање од 3 kDa, међу анализираним узорцима, испољиле су највећу способност инхибирања пероксил радикала, односно оксидација  $\beta$ -каротена представљена на Слици 7.20 преко степена обезбојавања била је најмања. Вредности степена обезбојавања након 120 минута инкубације при крајњој концентрацији пептида од 1000 ppm за узорке хидролизата, фракције-1, фракције-2, фракције-3, фракције-4, фракције-5 износиле су  $19,63 \pm 1,98$ ,  $32,96 \pm 1,65$ ,

34,76±2,14, 22,85±2,62, 18,89±2,23 и 13,28±2,31%, редом. Наведене вредности знатно су ниже у поређењу са негативном контролом, нетретираним нативним беланцем при истој крајњој концентрацији (63,34±2,57%), али су веће од вредности синтетичког антиоксиданта Тролокса у крајњој концентрацији 100 ppm (5,78±1,88%). Јасно је да је хидролизат био инфериорнији од фракције-4 и фракције-5, и да је испољио антиоксидативну активност сличну оној у фракцији-3, што је у сагласности са резултатима претходног липидног система, али и са резултатима изведеним са другим антиоксидативним тестовима, по којима се управо фракција-3 и фракција-4 издавају као најактивније. Због тога, активности пептида са аспекта неутралисања слободних радикала може се повезати са инхибицијом оксидације линолне киселине, како су систему са линолном киселином, тако и у систему β-каротена-линолна киселина. О повезивању ових активности постоји незнатан број истраживања, међу којима се првенствено истичу резултати антиоксидативне активности хидролизата пшеничног глутена, њихових изолованих базних и киселих фракција, где је хидролизат испољио интензивнији ефекат инхибиције оксидације линолне киселине у систему емулзије β-каротен-линолна киселина (након 60 и 120 минута инкубације), при чему је корелација инхибиторне активности слободних радикала и инхибиције пероксидације била очигледна.<sup>334</sup> Насупрот томе, група истраживача није успела на основу антиоксидативних активности одређених помоћу ORAC и DPPH анализа да предвиди активност добро познатих антиоксиданата да инхибирају липидну оксидацију у емулзији кукурузно уље у води.<sup>335</sup>

Анализирањем промене апсорбанце током инкубације, мерењем апсорбанци сваких 15 минута на 470 nm (*резултати нису приказани*), евидентно је смањење вредности апсорбанци, најинтензивније за узорке пептида из фракције-1, фракције-2 и фракције-3. За остале узорке пептида протеина беланцета смањење апсорбанци је значајно мање. Наведено смањење указује на оксидацију β-каротена у испитаном систему проузроковану слободним радикалима насталим оксидацијом линолне киселине. Формирани слободни радикали реагују са незасићеним молекулима β-каротена, што је довело до губитка хромофорне структуре и обезбојавања карактеристичне наранџасте боје. Најизраженије смањење вредности апсорбанци примећено је код анализираниог узорка без присуства пептида, тзв. негативна контрола, са вредношћу степена обезбојења 96,38±0,86%. Статистички значајна разлика промене апсорбанце током инкубације није уочена у систему са пептидима

хидролизата, фракције-4 и фракције-5 ( $p > 0,05$ ), при чему је важно истаћи да се у времену апсорбанца незнатно мењала. Код осталих узорак пептида смањење апсорбанце у времену је било израженије. Овим резултатима показано је да је степен обозбојавања  $\beta$ -каротена мање изражен услед неутралисања слободних радикала од стране пептида из узорак хидролизата, фракције-4 и фракције-5. Иако постоје разлике међу узорцима, у испитаном систему емулзије, њихова антиоксидативна активност ипак је била нижа од позитивне контроле, Тролокса. Претпоставља се да ова разлика може бити узрокована разликом поларности Тролокса и узорак пептида протеина беланцета. Истраживања су показала да хидрофобни антиоксиданти имају већу ефикасност од хидрофилних антиоксиданата у спречавању оксидације у системима емулзија типа уље у води, са могућношћу оријентисања на граници фаза уље-вода.<sup>210</sup> Група аутора је у свом истраживању антиоксидативног капацитета хидролизата протеина мишића из црвенкасте морке рибе утврдила да способност припремљених хидролизата са алкалазом и флеворзимом да инхибирају оксидацију  $\beta$ -каротена зависи од амфифилног карактера аминокиселина које улазе у његов састав.<sup>336</sup> Такође, сагласно дискутованим резултатима са Сlike 7.20, други литературни подаци о хидролизатима протеина тропске рибе нилска талипија (*Nile tilapia*) истичу да хидролизат припремљен двостепеним поступком са алкалазом и папаином испољава значајну антиоксидативну активност са аспекта инхибиције липидне оксидације у систему емулзије уље у води, при чему током инкубације од 120 минута нису уочили значајне разлике у концентрацијама узорак 500 и 1000 ppm. За овај хидролизат истраживачи су утврдили да садржи велики проценат хидрофобних аминокиселина, а као доминантне аминокиселине истичу се лизин, аспарагин и глутамин и управо високе вредности антиоксидативних активности приписују оваквом аминокиселинском саставу.<sup>337</sup>

Како је познато да је оријентација хидрофобног дела пептида у уљаној фази и хидрофилног дела у воденој фази на граници фаза основни принцип стабиловања емулзија, може се рећи да приказани резултати сугеришу да хидролизат протеина беланцета и/или изоловане фракције пептида садрже пептиде са хидрофилним и хидрофобним остацима. Услед таквог састава, претпоставља се да се хидрофобни делови пептида могу адсорбовати на капљицама уља, док се хидрофилни домени пептида радије задржавају у воденој фази. Самим тим оријентација пептида са антиоксидативном активношћу на граници фаза уље-вода изузетно доприноси

њиховој антиоксидативној активности на капљици уља. Као резултат тога антиоксидативна активност може бити максимална на граници фаза емулзије.

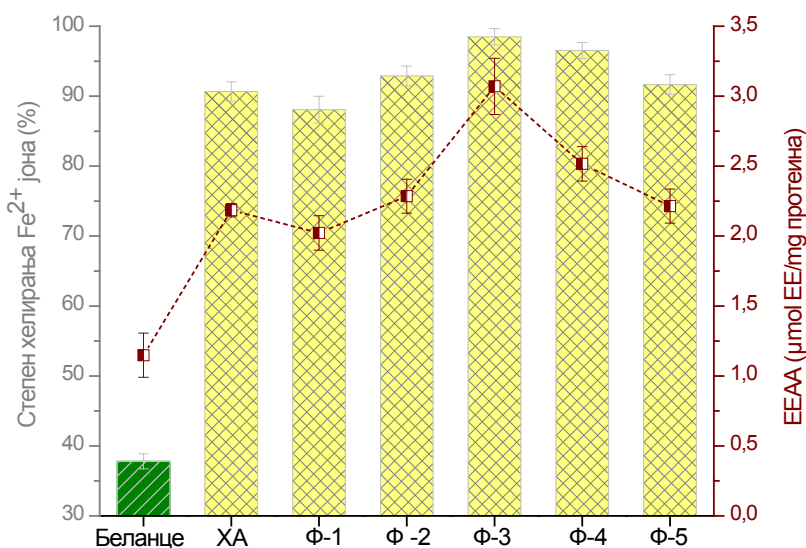
Генерално, на основу резултата **способности пептида протеина беланцета да инхибирају липидну пероксидацију**, сугерише се да изоловани пептиди могу имати улогу конзерванаса хране спречавајући пероксидацију липида и повећавајући свежину намирница. У зависности од биорасположивости током оралне администрације, пептиди протеина беланцета могу се користити и као инхибитори пероксидације липида, нарочито у крвним судовима, што би потпомогло одржавању константног протока крви и спречавању таложења липидних наслага. Овакав приступ омогућио би значајне здравствене предности са аспекта хипертензије и кардиоваскуларних обољења.

#### **7.4.3. Утицај састава и величине пептида на способност хелирања металних јона**

Јони прелазних метала, пре свега  $Fe^{2+}$  јони, подстичу липидну пероксидацију преко Фентонове реакције ( $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} \cdot OH + OH$ ), али и убрзавају липидну пероксидацију разградњом хидропероксида незасићених масних киселина на пероксил и алкоксил радикале који подстичу ланчану реакцију оксидације. Добро је познато да јони прелазних метала учествују у многобројим оксидационим реакцијама *in vivo* где катализују познату Хабер-Вајсову (Haber–Weiss) реакцију и индукују образовање хидроксил радикала преко супероксид анјона. Хидроксил радикали брзо реагују са суседним биомолекулама и изазивају тешка оштећења, како биолошких молекула тако и ћелија. Сходно томе, способност антиоксиданата да учествују у хелирању металних јона је значајна јер се хелирањем смањује концентрација слободних јона прелазних метала који катализују липидну оксидацију.<sup>329, 338</sup> Литературни подаци указују и на то да је инхибирање хидроксил радикала посредством антиоксиданата делотворно углавном посредством механизма хелирања металних јона. С обзиром да биолошки активна једињења посредством каталитичке активности са јонима метала могу утицати на пероксидативни процес, мерење способности хелирања металних јона важно је за процену укупне антиоксидативне активности према слободним радикалима.<sup>338</sup>

У присуству хелирајућег агенаса, као што су антиоксидативни пептиди, комплекс ферозин- $Fe^{2+}$  се разграђује, при чему се разградња манифестује смањењем

интензивног обојења. Познато је да су пептиди мањих молекулских маса изузетно погодни за хелирање  $\text{Fe}^{2+}$  јона и да на тај начин успешно елиминишу токсичне концентрације метала гвожђа у прехранбеним производима. Пошто су у претходним *in vitro* тестовима инхибиције липидне пероксидације анализирани узорци хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz, али и изоловане фракције пептида, са разлогом је у овој фази истраживања антиоксидативна активност узорака пептида верификована одређивањем утицаја састава и величине пептида ових узорака на способност хелирања металних јона. Добијени резултати изражени као степен хелирања јона  $\text{Fe}^{2+}$  и као  $\mu\text{mol EDTA}$  еквивалената (EE)/mg протеина (EEAA вредности) приказани су на Слици 7.21.



**Слика 7.21.** Степен хелирања  $\text{Fe}^{2+}$  јона у присуству пептида различитог састава и величине изолованих из хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом ( $20 \pm 0,2$  kHz). Легенда: ХА-хидролизат протеина беланцета припремљен алкалазом, Ф-1 до Ф-5 су фракције пептида изоловане из хидролизата.

Приказни резултати недвосмислено показују да хидролизат протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом и ултрафилтрационе фракције пептида показују значајно ( $p < 0,05$ ) већу способност хелирања  $\text{Fe}^{2+}$  јона у односу на нативно нетретирано беланце ( $37,80 \pm 1,07\%$ ). Међу узорцима пептида са аспекта састава и величине пептида запажа се разлика која се најпре огледа у томе да фракције пептида велике молекулске масе садржане од полипептида, фракција-1 и фракција-2, имају мању способност хелирања  $\text{Fe}^{2+}$  јона у поређењу са фракцијама које садрже ди- и три- и олигопептиде, односно пептиде са 2-6 аминокиселинска

остатка ( $88,07 \pm 1,91$  и  $92,89 \pm 1,40$  %, редом). Међу узорцима фракције-3 и фракције-4, са пептидима молекулске масе 3-10 и 1-3 kDa, редом, не запажа се значајнија разлика ( $p > 0,05$ ) у степену хелирања  $Fe^{2+}$  јона, па се обе фракције могу сматрати веома ефикасним за хелирање јона прелазних метала. Вредности степена хелирања  $Fe^{2+}$  јона за ове две фракције изосиле су  $98,48 \pm 1,17$  и  $96,53 \pm 1,15$  %, редом, па ове високе вредности јасно указују на чињеницу да су ефикасне за спречавање липидне пероксидације, што је како је претходно наведено, важно приликом имплементације пептида у прехранбене производе. Резултати добијени у овој фази истраживања у сагласности су са резултатима способности инхибиције липидне пероксидације из одељка 7.4.3. Одређивањем концентрације пептида која одговара хелатној активности од 50%, утврђено је да са порастом концентрације пептида изолованих фракција, фракције-3 и фракције-4, повећава се хелатна активност, при чему је коефицијент детерминације у линеарној регресији у оба случаја био 0,995. Одређене минималне концентрације износиле су  $0,452 \pm 0,014$  и  $0,496 \pm 0,011$  mg/cm<sup>3</sup>, редом. У поређењу са позитивном контролом, EDTA у концентрацији 0,1 mg/cm<sup>3</sup> чији је степен хелирања  $Fe^{2+}$  јона износио  $98,65 \pm 1,02$ %, фракције пептида масе 3-10 и 1-3 kDa показале су приближно идентичне вредности међу којима није постојала статистички значајна разлика ( $p > 0,05$ ).

Ове вредности могу се упоредити са резултатима добијених за друге хидролизате и фракције. Фракција пептида молекулске масе 5-10 kDa изолована из хидролизата протеина соје испољила је скоро 1,5 пута већу вредност минималне концентрације потребне за хелирање 50%  $Fe^{2+}$  јона,  $0,29$  mg/cm<sup>3</sup>, у поређењу са најактивнојом фракцијом протеина беланцета (3-10 kDa).<sup>339</sup> Прегледом доступних студија, мало је података о метал-јон хелатној активности фракција пептида изолованих из хидролизата протеина беланцета, свега неколико. У једном истраживању пречишћени су и окарактерисани антиоксидативни пептиди из протеина беланцета гущчијих јаја припремљених хидролизом са неколико ензима. Два пептида именована као p14 и p16 показали су највише активности хелирања металних јона. Вредности IC<sub>50</sub> за оба пептида су утврђене, а резултати показују да је за степен хелирања металних јона од 50% била потребна концентрација пептида  $170,6$  и  $117,9$  μM, редом.<sup>61</sup> Хидролизат протеина беланцета припремљен комбинацијом ензима трипсина и папаина, испољио је значајно вишу активност хелирања  $Fe^{2+}$  јона ( $\sim 55\%$ ) у поређењу са хидролизатом припремљеним



једноступеном хидролизом, али је ова вредност за чак 35% нижа у поређењу са хидролизатом припремљеним алкалазом са Сlike 7.21.<sup>209</sup> Такође, изолована фракција пептида из истог хидролизата именована као фракција 2 имала је значајно вишу вредност  $IC_{50}$  ( $1,35 \pm 0,065 \text{ mg/cm}^3$ )<sup>209</sup> у поређењу са најактивнијом фракцијом-3 из овог истраживања ( $0,452 \pm 0,014 \text{ mg/cm}^3$ ). Иста група аутора истакла је да хидрофобне карактеристике хидролизата и/или изолованих пептидних фракција имају значајну улогу у инхибирању слободних радикала добијених из липида и да киселе (Asp и Glu) и базне (Arg и Lys) аминокиселине имају најзначајнију улогу приликом хелирања металних јона.<sup>209</sup> Протеински хидролизат јаја шарана припремљен алкалазом испољио је позитивну корелацију између степена хелирања  $Fe^{2+}$  јона и концентрације, при чему је израчуната вредност  $IC_{50}$  износила  $2,04 \text{ mg/cm}^3$ . Истакнуто је, да ензимска хидролиза резултира већом способношћу везивања металних јона услед повећане концентрације карбоксилних група и аминокиселина у остацима киселих и базних аминокиселина које улазе у састав пептида.<sup>340</sup> Интересантно је да су истраживачи при извођењу хидролизе неутразом како протеина беланцета, тако и жуманцета произвели хидролизате са високим вредностима везаних јединица јона метала изражених као  $\mu\text{mol } Fe^{2+}/\text{mg}$  протеина, при чему су се протеини жуманцета због свог аминокиселинског састава показали као бољи антиоксиданти.<sup>341</sup>

Литературни подаци истичу да оптимално хелирање прелазних метала укључује присуство алифатичних једињења у којима се може формирати петочлани прстен који се састоји од јона метала и два лиганда која учествују у хелирању. С обзиром на наведено, аминокиселина хистидин се због присуства имидазолног прстена сматра снажним хелационим једињењем.<sup>342</sup> Две групе аутора приметиле су занемариву метал-јон хелатну активност глутатиона, на основу чега се са сигурношћу може истаћи да присуство аминокиселине цистеин у глутатиону није од значајне важности за испољавање метал-хелатне активности.<sup>338, 342</sup> Истраживачи су утврдили висок степен хелирања  $Fe^{2+}$  јона пермеата у вредности од 95% након трочасовне хидролизе протеина грашка термолизином и накнадне ултрафилтрације кроз мембрану од 3 kDa, при чему су такође указали и на важност ароматичних и хидрофобних аминокиселина присутних у изолованим пептидним фракцијама.<sup>342</sup> По резултатима Оливиера (Oliveira) и сарадника може се приметити да повећањем времена извођења ензимске хидролизе изолата сојиних протеина смањује се метал-

јон хелатна активност, што може указати на чињеницу да олигопептиди већих молекулских маса одговорни за уочену антиоксидативну активност даљом хидролизом се разложени на пептиде мањих молекулских маса са значајно мањом способношћу хелирања  $Fe^{2+}$  јона.<sup>343</sup> Највећа метал-јон хелатна активност остварена је након једног сата ензимског третмана изолата сојиних протеина са вредношћу 61%, која је чак 35% мања у односу на резултате пептида изолованих из хидролизата протеина беланцета са Сlike 7.21, при чему је важно истаћи да је и полазна концентрација у случају сојиних протеина била већа чак 3,5 пута. Насупрот дискутованим резултатима са Сlike 7.21, истраживања која су се односила на хидролизате припремљене ензимском хидролизом протеина уљане репице<sup>344</sup> и конопље,<sup>345</sup> као и њихових ултрафилтрационих фракција пептида, фракције са пептидима дужих полипептидних ланаца (5-10 kDa) испољиле су већу способност хелирања металних јона у поређењу са пептидима < 3 kDa. Добијене резултате истраживачи су објаснили синергистичким ефектом већег броја аминокиселинских остатака у поређењу са пептидима краћих пептидних ланаца. Осим ове синергистичке интеракције, резултати сугеришу да присуство ароматичних прстенова из аминокиселина у пептидним фракцијама доприноси већој способности хелирања јона метала, а показана је и снажна позитивна корелација са садржајем укупних ароматичних киселина и укупним процентом хидрофобних аминокиселина.<sup>342</sup> Међутим, друга студија истиче да су фракције пептида изоловане из хидролизата протеина сунцокрета са најмањом хидрофобношћу и највећим садржајем хистидина имале највећу активност хелирања јона метала сугеришући на чињеницу да је имидазолов прстен одговоран за активност.<sup>346</sup> Са друге стране, хидролиза хемоглобина алкалазом и флеворзимом довела је до изразитог смањења способности хелирања јона гвожђа у поређењу са нехидролизованом протеином.<sup>347</sup> Према изнетим подацима, али пре свега на основу претпоставки и корелације са осталим антиоксидативним активностима из одељака 7.4.1 и 7.4.2, могуће је претпоставити да фракције пептида протеина беланцета, фракција-3 и фракција-4, обилују високим садржајем ароматичних и хидрофобних аминокиселина, пре свега Пе, Леу, Тур, Пхе, Трп, Про и Вал, али није искључиво да можда једна од њих садржи већи садржај хистидина.

Генерално, приказани и дискутовани резултати у потпоглављу 7.4 указују на потенцијалну примену хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвуком

високог интензитета и њихових ултрафилтрационих фракција као антиоксиданата у контролисању поремећаја метаболизма повезаних са оксидативним стресом у биолошким ћелијама. Изузетно повољним чине се хидролизати који се као такви могу користити као сировине за производњу пептида који се могу користити као суплементи за формулисање нових функционалних производа и/или нутрацеутика. Такође, хидролизати се могу користити и као природни извор антиоксиданата (конзерванси) у прехранбеној индустрији како би се спречила оксидација липида и одржала свежина током производње и складиштења прехранбених производа. Међутим, за спречавање липидне пероксидације у прехранбеним производима неопходно је користити изоловане фракције пептида тачно дефинисаног састава и величине полипептидних ланаца као антиоксиданте. Сходно резултатима, евидентно је да зависно од степена биорасположивости, врсте и састава, пептиди протеина беланцета могу понудити одређени ниво заштите ћелијама против токсичних ефеката реактивних кисеоничних врста и јона прелазних метала, при чему се фракције молекулских маса 3-10 и 1-3 kDa, издвајају као оне са највишим нивоима инхибиције слободних радикала и липидне пероксидације, али и степена хелирања  $Fe^{2+}$  јона. Важно је истаћи да су хидролизат протеина беланцета и изоловане фракције пептида испољили веће антиоксидативне активности од нативног нетретираног беланцета. Овакав резултат последица је, пре свега, великог броја ослобођених биоактивних пептида услед специфичне активности ендо-пептидазе алкалазе чиме је омогућена интеракција добијених пептида са оксидационим средствима. Беланце, јефтин индустријски нуспроизвод, спада у групу најквалитетнијих протеина са високом нутритивном вредношћу, због чега се ензимски произведене смеше пептида, како хидролизати, тако и изоловане фракције потенцијално могу користити као висококвалитетни протеински додаци при формулисању производа намењених спортистима, реконвалесцентима и људима са поремећеним дигестивним трактом, хипоалергијских формулација за одојчад, али и као функционални додаци производима широке потрошње на тржишту наше земље. При формулисању нових функционалних прехранбених производа додавањем хидролизата и пептида беланцета, због изражене антиоксидативне активности, испитане у оквиру овог истраживања, могуће је заменити ензим супероксид дисмутазу и друге антиоксидативне ензиме.

## 7.5. АНТИПРОЛИФЕРАТИВНА АКТИВНОСТ ИЗЛОВЕНИХ ФРАКЦИЈА ПЕПТИДА ИЗ НАТИВНИХ ПРОТЕИНА БЕЛАНЦЕТА

Карцином дојке и колоректални карцином два су водећа узрочника превремене смрти код жена и мушкараца у цивилизованом свету. Поред породичне склоности ка обољењу, најчешћи узрок болести су оксидативни стрес и неправилна, нездрава исхрана. Вишак слободних радикала може проузроковати одвијање различитих оксидативних реакција, које пак могу довести до оштећења ћелија и/или њихових делова. Као такав, оксидативни стрес и слободни радикали сматрају се иницијаторима и/или пропагаторима болести попут кардиоваскуларних болести, упалних процеса, канцера и дијабетеса.<sup>2-3</sup> Зато је успоравање оксидативних процеса у ћелијама услед узимања различитих дијететских суплемената или у храни услед додатака различитих природних и синтетских антиоксиданаса од посебног значаја.

Протеини беланцета чини се изузетно повољним извором протеина јер садрже све есенцијалне аминокиселине неопходне за нормално одвијање метаболизма, нарочито је висок садржај аминокиселина са сумпором. Поред тога, нативни протеини беланцета, изоловане протеинске фракције (нпр. овалбумин, овотрансферин, овомукоид, лизозим) и/или њихови хидролизати испољили су велики број биолошких активности попут антиоксидативне,<sup>60, 63, 209, 348</sup> антихипертензивне,<sup>95, 349-352</sup> антикоагулативне,<sup>353</sup> антипролиферативне или антитуморске,<sup>354</sup> антимикробне,<sup>10, 209, 355</sup> способности везивања антитела овомукоида и антивиралне активности према вирусу западног нила,<sup>356</sup> као и дипептидил пептидаза-IV (DPP-IV) инхибиторну активност.<sup>37</sup> Постоји свега неколико студија које разматрају антитуморско дејство хидролизата протеина беланцета и то само изолованих протеинских фракција, најчешће лизозима и овотрансферина, али још увек нису идентификовани биоактивни пептиди који настају хидролизом нативних протеина беланцета, а поседују антиоксидативну активност и инхибиторни ефекат на пролиферацију хуманих туморских ћелија као што су ћелијска култура аденокарцинома дојке и ћелијска линија колоректалног аденокарцинома. Нарочито није проучен утицај ултразвучног претретмана на профил пептида и њихову антипролиферативну активност, као и синергизам између претходно наведених биолошких својстава, чиме би се омогућило добијање производа широке потрошње.

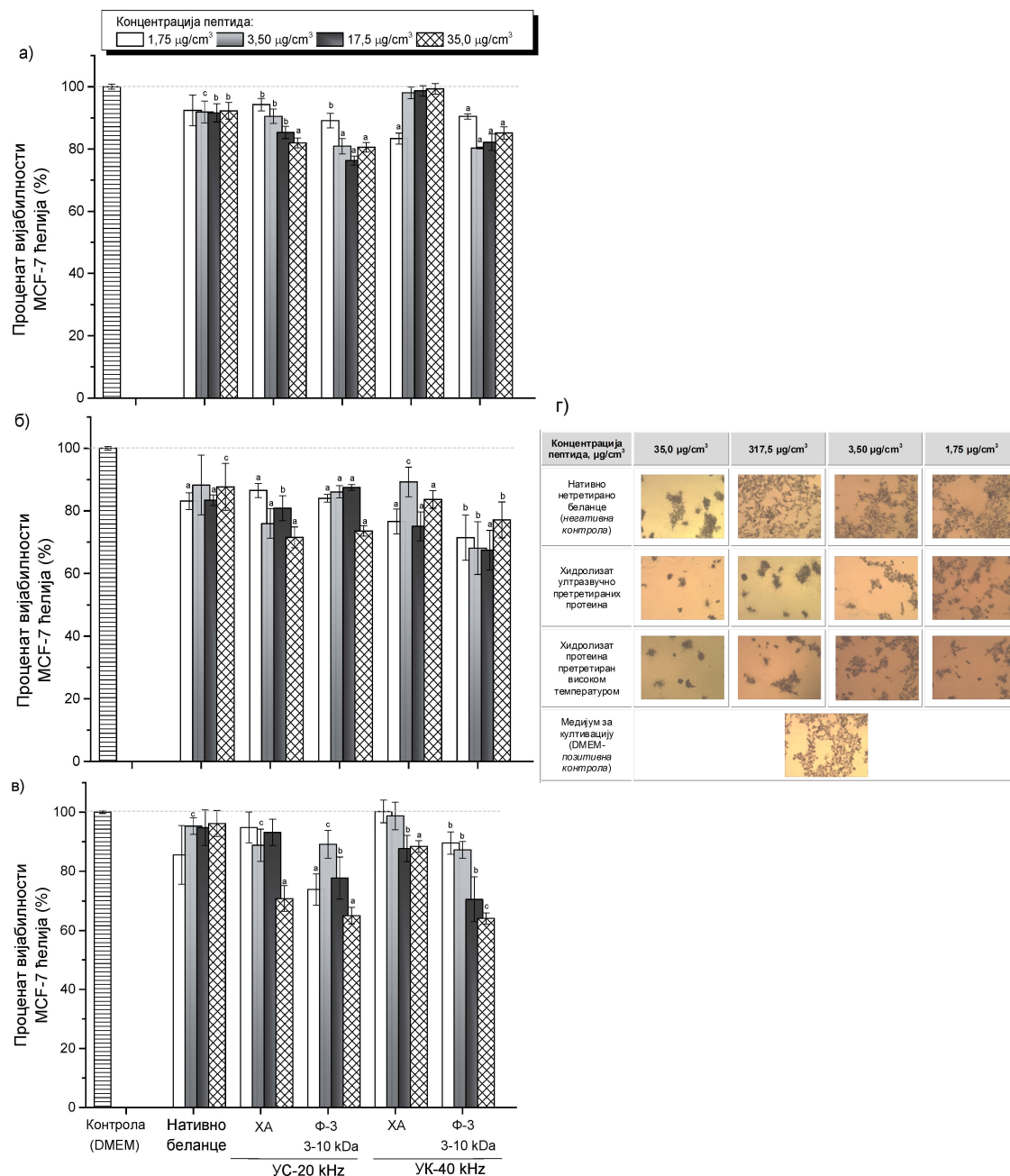
Осим тога, још није потврђено да ли сам хидролизат нативних протеина беланцета добијен под одређеним условима показује антипролиферативну активност, што би било од значаја јер би као такав имао већу нутритивну вредност него хидролизат изолованих појединачних протеинских фракција.

#### **7.5.1. Утицај састава и величине пептида на способност инхибирања пролиферације туморских ћелијских линија**

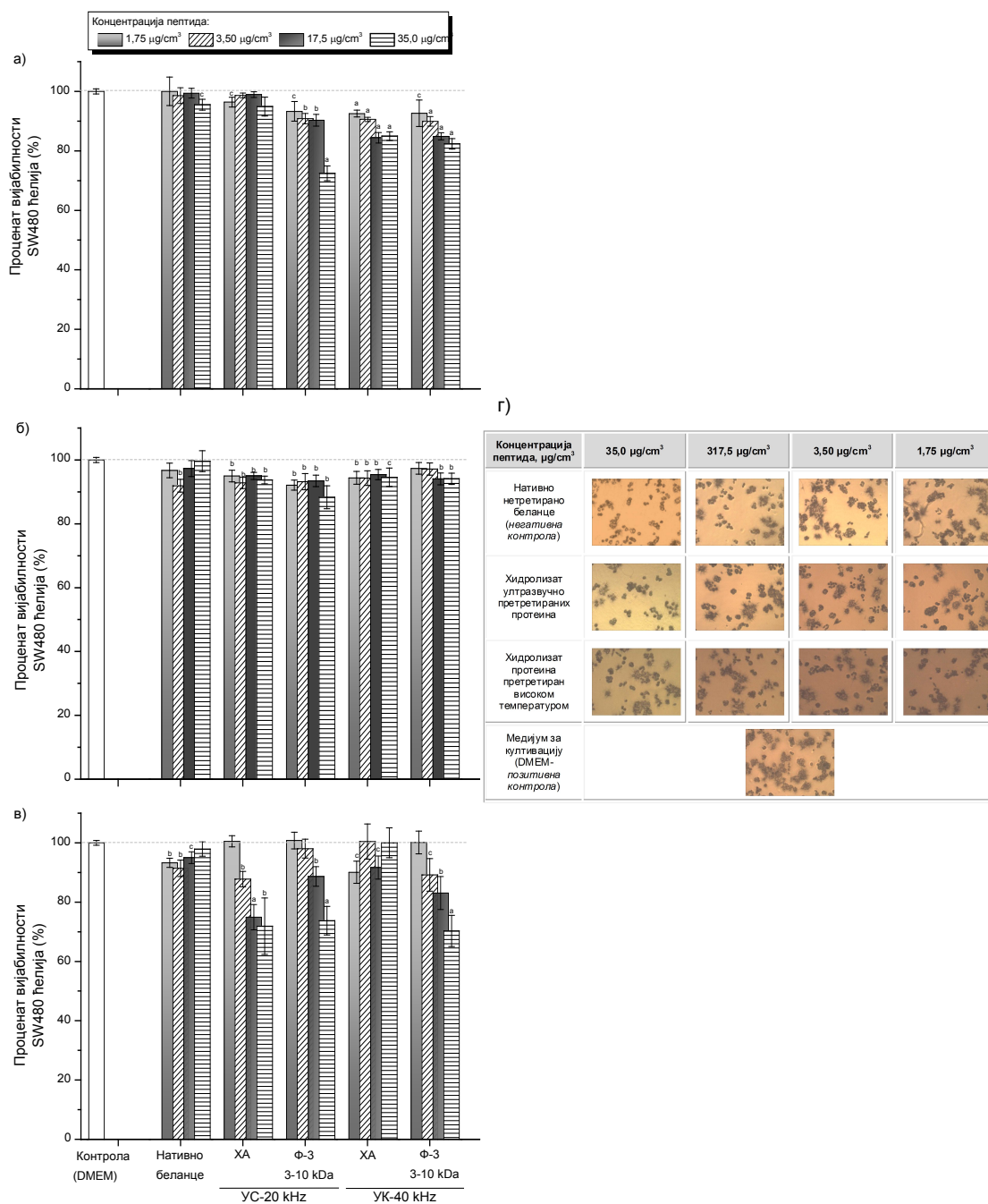
Следствено претходно наведеним чињеницама, у овој фази истраживања антипролиферативна активност хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвуком високог интензитета, фреквенци  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz, и/или њихових изолованих фракција пептида, молекулске масе 3-10 kDa, тестирана је на хуманим туморским ћелијским линијама: MCF-7 (хумана ћелијска линија аденокарцинома дојке) и SW480 (хумана ћелијска линија колоректалног аденокарцинома). MCF-7 је ћелијска линија епителнијалног типа изолована из малигног плеуралног излива. MCF-7 ћелије испољавају специфичне карактеристике епитела дојке, као што су очувана естрогенска осетљивост и задржан ниво естрогенских рецептора. SW480 је такође ћелијска линија епителнијалног типа изолована из колоректалног аденокарцинома 3-4 ступња. Испитивани узорци пептида како у облику хидролизата и/или фракција изабрани су за евалуацију антипролиферативне активности на основу високих вредности антиоксидативних активности са аспекта инхибиције слободних радикала, инхибиције липидне пероксидације и хелирања металних јона (потпоглавље 7.4). Испитивања инхибиторног дејства на пролиферацију туморских ћелија MCF-7 и SW480 хидролизата и/или фракција пептида извршена су колориметријским MTT тестом, који се заснива на редукцији жуте тетразолијумове соли (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид–MTT). Додатно, испитивање цитотоксичног ефекта хидролизата и/или фракција пептида, крајњих формулација пептида, обухватило је тестирање утицаја хидролизата и/или фракција пептида, при различитим концентрацијама, на пролиферацију мезенхималних матичних ћелија изолованих из перидонталног лигамента (PDLSCs), као типа примарних хуманих ћелија. Добијени резултати инхибиције пролиферације MCF-7 и SW480 ћелија током инкубације 24, 48 и 72 сата, изражени као средње вредности процента вијабилности  $\pm$  стандардна грешка и нормализоване у односу на контролу, графички су приказани на Сликама 7.22 (Прилог 1) и 7.23 (Прилог 1), редом. Као позитивна

контрола коришћен је стандардни медијум за култивацију ћелија (*на енгл.* Dulbecco's modified Eagle's medium-DMEM), док је негативна контрола било нативно нетретирано беланце. Ради поређења хидролизата протеина претретираних различитим третманима и утврђивања дејства претретмана, као контролни хидролизат теститан је хидролизат протеина беланцета термички претретираних.

На основу резултата колориметријског МТТ теста евидентно је да хидролизати протеина беланцета претретираних ултразвуком различите фреквенце утичу на пролиферацију туморских колоректалних ћелија и ћелија дојке, при чему се уочава јасна зависност способности инхибиције пролиферације ћелија од концентрације протеина и/или времена инкубације (Слике 7.22 и 7.23). У току првих 24 часова инкубације узорка пептида са MCF-7 туморским ћелијама, хидролизат протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz испољио је статистички значајан антипролиферативни ефекат при свим испитаним концентрацијама пептида ( $p < 0,01$ ), за разлику од хидролизата припремљеног хидролизом протеина беланцета претретираних у ултразвучном купатилу фреквенце  $40 \pm 2$  kHz, који је инхибиторни ефекат на раст ћелија аденокарцинома дојке испољио само при концентрацији  $1,75 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ . Инхибиторно дејство смеше пептида из узорка хидролизата протеина соницираних ултразвуком средњег интензитета ( $40 \pm 2$  kHz) на пролиферацију ћелијске линије SW480 у првих 24 сата инкубације статистички је значајније ( $p < 0,001$ ) у поређењу са контролним медијумом (DMEM), док испитане концентрације другог хидролизата ( $20 \pm 0,2$  kHz) нису резултирале инхибиторним дејством. Приказани резултати наглашавају да узорци хидролизата соницираних протеина беланцета испољавају статистички значајан инхибиторни ефекат на пролиферацију туморских ћелијских линија MCF-7 (Слика 7.22) и SW480 (Слика 7.23) поредећи их са контролним медијумом, након 48 сати инкубације, при свим концентрацијама, првенствено при концентрацијама  $35,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  ( $p < 0,001$ ) и  $17,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  ( $p < 0,01$ ), редом. По завршетку инкубационог периода од 72 сата, евидентно је да хидролизат протеина беланцета третираних ултразвучном сондом, концентрације пептида  $17,5$  и  $35,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  поседује знатно ( $p < 0,001$ ) већу антипролиферативну активност према туморским ћелијама MCF-7 и SW480 у поређењу са хидролизатом протеина соницираних ултразвуком фреквенце  $40 \pm 2$  kHz.



**Слика 7.22.** Утицај састава и врсте пептида из смеше хидролизата протеина и фракција пептида протеина беланцета претретираних ултразвучним таласима на пролиферацију хумане ћелијске културе аденокарцинома дојке, MCF-7, током 24 часа (а), 48 часова (б) и 72 часа (в) инкубације. Значајне разлике у резултатима су узете у обзир при следећим вредностима вероватноће:  $^a p < 0,001$ ,  $^b p < 0,01$ ,  $^c p < 0,05$ . г) Морфолошке промене на хуманим ћелијским културама аденокарцинома дојке током 72 сата под дејством протеинских хидролизата претретираних ултразвуком фреквенце  $40 \pm 2$  kHz и/или термички (увећање приликом сликања 400x; види Прилог 1).



**Слика 7.23.** Утицај састава и врсте пептида из смеше хидролизата протеина и фракција пептида протеина беланцета претретираних ултразвучним таласима на пролиферацију хумане ћелијске културе колоректалног карцинома, SW480, током 24 часа (а), 48 часа (б) и 72 часа (в) инкубације. Значајне разлике у резултатима су узете у обзир при следећим вредностима вероватноће: <sup>а</sup>  $p < 0,001$ , <sup>б</sup>  $p < 0,01$ , <sup>в</sup>  $p < 0,05$ . г) Морфолошке промене на хуманим ћелијским културама колоректалног карцинома током 72 сата под дејством протеинских хидролизата претретираних ултразвуком фреквенце  $40 \pm 2$  kHz и/или термички (увећање приликом сликања 400x; види Прилог 1).



Уопштено, могуће је констатовати да су туморске ћелије MCF-7 и SW480 изложене већем цитотоксичном ефекту у случају када су подвргнуте дејству хидролизата при већим концентрацијама пептида. Додатно, важно је нагласити да су хидролизати ултразвучно претретираних протеина беланцета показали већи инхибиторни ефекат на пролиферацију туморских ћелија MCF-7 и SW480 од хидролизата протеина претретираних термички (резултати приказани на Сликама 7.22г, 7.23г; Прилог 1) након 48 и 72 сати инкубације при свим концентрацијама, изузев при концентрацији  $35,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  после 48 сати инкубације. При овој концентрацији добијени степени вијабилности туморских ћелија MCF-7 за хидролизате протеина претретираних ултразвучном сондом, ултразвучним купатилом и термички износили су  $71,52 \pm 3,32$ ;  $83,60 \pm 2,83$  и  $84,66 \pm 8,84$  %, редом и статистичком анализом није забележена разлика ( $p > 0,05$ ). Идентично, при концентрацији  $1,75 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  добијени степени вијабилности туморских ћелија SW480 након 48 сати за хидролизате протеина претретираних ултразвуком 20 и 40 kHz, и високом температуром износили су  $98,13 \pm 1,87$ ;  $90,07 \pm 3,75$  и  $94,39 \pm 1,99$  %, редом, а статистичком анализом није забележена значајна разлика ( $p > 0,05$ ). Узорак нетретираниог нативног беланцета, негативна контрола, у поређењу са хидролизатима протеина беланцета и позитивном контролом, није утицао на инхибицију пролиферације обе туморске ћелијске линије. Веома мали степен инхибиције уочава се након завршетка 72 сата инкубације са туморским ћелијама SW480 при концентрацијама протеина  $1,75$ ,  $3,50$  и  $17,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  ( $p < 0,05$ ), али и после 72-очасовне инкубације са ћелијама карцинома дојке при концентрацији протеина  $3,50$ ,  $17,5$  и  $35,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ .

Постоји свега неколико студија које разматрају антитуморско дејство хидролизата протеина беланцета и то само изолованих протеинских фракција, најчешће лизозима и овотрансферина. У тим студијама описани су резултати изразито значајних антипролиферативних активности спровођењем тестова на различитим хуманим ћелијским линијама. Конкретно, протеинска фракција беланцета, овофтрансферин, и у већој мери хидролизат овотрансферина, при већим концентрацијама ( $40 \text{mg}/\text{cm}^3$ ) показују антитуморско дејство на неколико хуманих ћелијских линија укључујући аденокарциноме плућа (A549 и SK-MES-1), стомака (AGS), дојке (MCF-7), грла (Her-2), цервикса (HeLa) и јетре (HerG2). При мањим концентрацијама ( $\leq 5 \text{mg}/\text{cm}^3$ ), ни овотрансферин, ни било који од његових

хидролизата, нису испољили статистички значајан ефекат на пролиферацију туморских ћелија. Том приликом хумана ћелијска линија аденокарцинома дојке (MCF-7) показала је најмању сензитивност на хидролизате овотрансферина у односу на све тестиране хумане ћелије аденокарцинома.<sup>357</sup> У другој студији истиче се да је парцијалном хидролизом овотрансферина, који је претходно био подвргнут ауто-раскидању унутрашњих бисулфидних веза, после редукције добијени су хидролизати са већим инхибиторним дејством на пролиферацију туморских ћелијских линија MCF-7 и HCT-116.<sup>358</sup> Такође, истраживачи су показали да протеинска фракција беланцета, овомукоид, и њени хидролизати добијени под одговарајућим реакционим условима могу инхибирати пролиферацију ћелија карцинома, али и имати антивиралну активност.<sup>359-360</sup> Хидролизат протеинске фракције овотрансферина припремљен у двостепеном ензимском поступку коришћењем ензима promod 278P и термолизина, значајно инхибира пролиферацију ћелијских линија аденокарцинома желуца (AGS), дебелог црева (LeVo и HT-29), као и цервикса (HeLa) у вредности од 50% при концентрацијама (IC<sub>50</sub>) 0,79, 0,78, 0,92 и 0,78, редом.<sup>102</sup> У неким студијама је потврђено да лизозим појачава ефикасност третмана хемотерапијом,<sup>361</sup> али и да сам лизозим има велику инхибиторну активност на раст великог броја различитих тумора укључујући и канцер плућа, *in vivo* и *in vitro* када се администрира орално.<sup>362</sup>

Како је приказано на Сликама 7.22 и 7.23 протеинске фракције молекулске масе 3-10 kDa, изоловане из хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвучним таласима фреквенце  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz, показују снажну инхибицију пролиферације хуманих ћелија аденокарцинома (MCF-7 и SW480). Вијабилност хуманих ћелија аденокарцинома инхибирана је у зависности од количине пептида ( $1,75-35,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) и/или инкубационог времена (24-72 часа). Повећањем почетне концентрације пептидних фракција, па чак и продужењем времена инкубације, интензитет инхибиторног ефекта на пролиферацију туморских ћелија постајао је јачи. Тако, при концентрацији пептида  $1,75 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ , а током инкубације 24 и 48 сати, међу анализираним пептидним фракцијама није уочена статистички значајна разлика ( $p > 0,05$ ) вредности инхибиције пролиферације ћелијских линија аденокарцинома дојке, MCF-7. Наиме, после инкубације од 24 сата са пептидним фракцијама изолованих из хидролизата протеина претретираних ултразвучном сондом и у ултразвучном купатилу, проценат вијабилности ћелија аденокарцинома дојке у односу на контролни медијум износио је  $89,12 \pm 2,37$  и  $90,48 \pm 0,83\%$ , редом, док су

вредности након 48 сати биле  $83,99 \pm 1,23$  и  $71,43 \pm 7,17\%$ , редом. На крају последњег инкубационог периода (72 сата) при концентрацији пептидних фракција  $35,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  вредности процента вијабилности ћелија аденокарцинома дојке у односу на контролни медијум (Слика 7.22в) биле су  $64,98 \pm 2,83$  и  $64,08 \pm 1,91\%$ , редом за фракције пептида изолованих из хидролизата протеина претретираних ултразвуком  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz. При истој концентрацији пептида после 72 сата, инхибиторни ефекат пептида на пролиферацију колоректалног аденокарцинома, SW480, био је такође значајан, а вредности процента вијабилности ћелија колоректалног аденокарцинома у односу на контролни медијум (Слика 7.23в) биле су  $73,72 \pm 4,81$  и  $70,29 \pm 5,23\%$ , редом за фракције пептида изолованих из хидролизата протеина претретираних ултразвуком  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz. Овим резултатима јасно је показано је да је инхибиторни ефекат пептидних фракција на хуманим ћелијским линијама аденокарцинома значајно већи ( $p < 0,001$ ) у поређењу са стандардним медијумом за култивацију ћелија (позитивна контрола). Осим тога, евидентно је и да су фракције пептида изоловане из протеинских хидролизата испољиле изразитији и значајнији антипролиферативни ефекат на ћелијским линијама MCF-7 и SW480 наспрам хидролизата. Вијабилност MCF-7 ћелија, нормализована на контролни медијум, након инкубације 72 сата при највишим концентрацијалма пептида износила је  $64,98 \pm 2,83$  и  $64,07 \pm 1,91\%$  за фракције пептида изоловане из хидролизата протеина претретираних ултразвуком  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz, редом, односно 1,1 и 1,4 пута мања ( $p < 0,01$ ) од полазних протеинских хидролизата при истој концентрацији. У случају колоректалног аденокарцинома, при концентрацији  $35,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  на крају инкубационог периода од 72 сата, проценат пролиферације ћелија, нормализован на контролни медијум износио је  $73,72 \pm 4,81$  и  $70,29 \pm 5,23\%$  за фракције пептида изоловане из хидролизата протеина претретираних ултразвуком  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz, редом. У овом случају, поређењем са полазним протеинским хидролизатима, не запажа се значајна разлика у случају протеина претретираних ултразвуком  $20 \pm 0,2$  kHz, али је код протеина претретираних ултразвуком  $40 \pm 2$  kHz разлика статистички значајна ( $p < 0,05$ ) и пролиферација ћелијских линија SW480 мања је у случају фракције пептида. Генерално, може се истаћи да обе анализирани пептидне фракције молекулске масе 3-10 kDa испољавају највећу способност инхибиције пролиферације ћелијских линија MCF-7 и SW480 ( $p < 0,05$ ). Овим запажањем може се претпоставити да је антипролиферативна активност блиско повезана са присуством

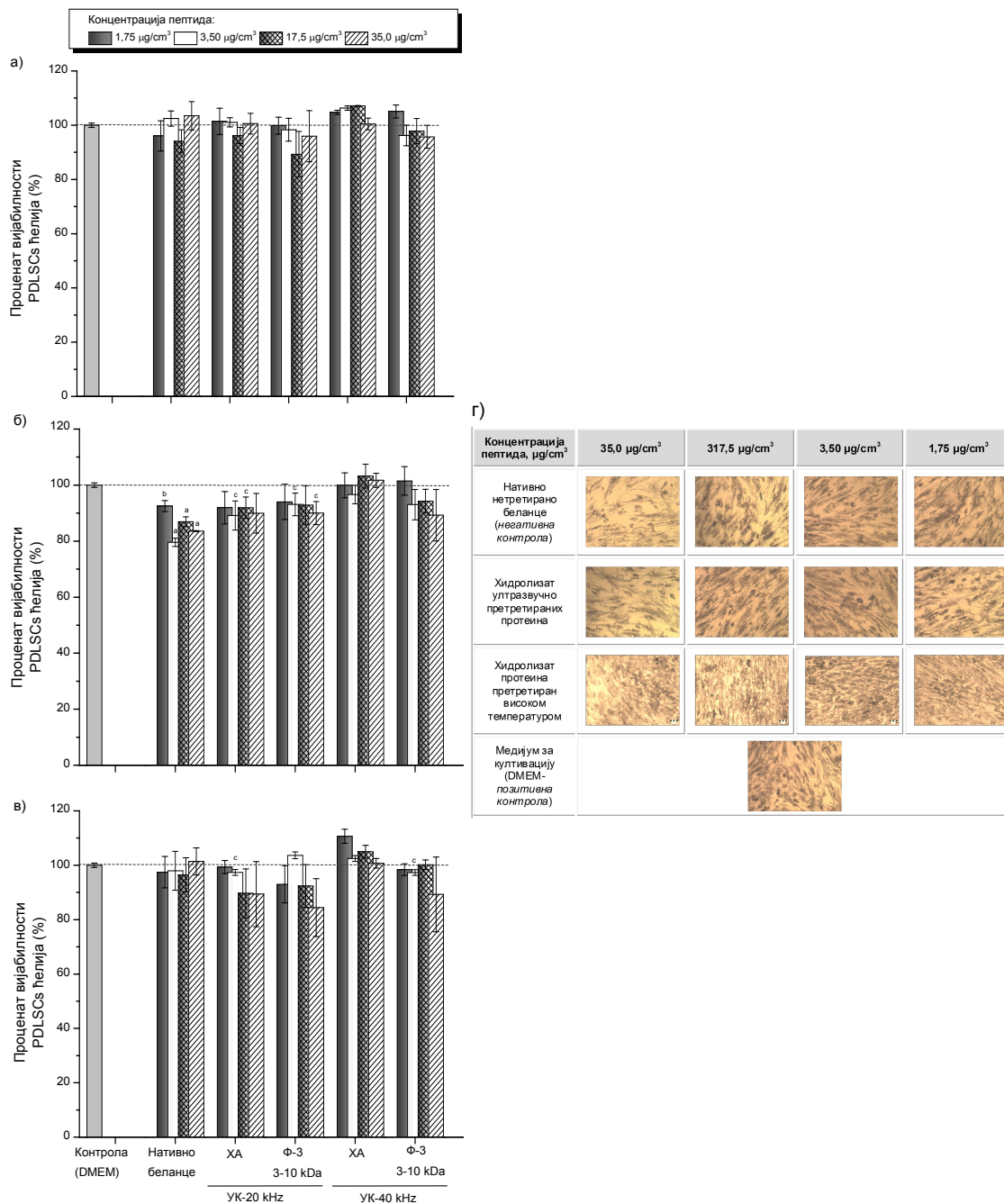
специфичних пептида који директно делују на ћелије аденокарцинома механизмом цитоотоксичности истих ћелија, што је у складу са подацима и закључцима студије о анти туморској активности пептида хемоглобина.<sup>363</sup> У истраживању хидролизата обезмашћених пиринчаних мекиња, стабилизаних високом температуром, пептидне фракције са пептидима молекулске масе 5-10 kDa и мање од 5 kDa показале су изразиту инхибиторну активност пролиферације ћелија карцинома за разлику од пептидних фракција са пептидима већих молекулских маса (>10 и >50 kDa).<sup>364</sup> Насупрот томе, пептидна фракција LPH-IV са пептидима мањих молекулских маса (<3 kDa), изолована из протеинских хидролизата беле рибе, показала је најбољу антипролиферативну активност на туморским ћелијским линијама хепатома HepG2, дојке MCF-7 и дебелог црева Caco-2.<sup>3</sup>

На основу целокупних резултата о анти туморској активности хидролизата нативних протеина беланцета и изолованих фракција пептида, као и увида у свега неколико студија које разматрају анти туморско дејство хидролизата протеина беланцета и то само изолованих протеинских фракција, може се закључити да показани антипролиферативни ефекат два ензимска хидролизата и две пептидне фракције молекулске масе 3-10 kDa зависи од типа туморске ћелије линије, примењене концентрације пептида и времена инкубације. Као најизражајнији ефекат на ћелијске линије аденокарцинома дојке и колоректалног аденокарцинома издаваја се управо онај антипролиферативан ефекат који су испољили узорци изолованих ултрафилтрационих фракција пептида, у којима су нативни протеини беланцета непосредно пре ензимске хидролизе били подвргнути кавитационом ефекту. У том случају, нарочито је инхибиција пролиферације изражена при концентрацијама узорака од 35,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  и инкубацији од 72 сата за хумане ћелије аденокарцинома MCF-7 и SW480. Слично понашање је показао и протеински хидролизат код кога су протеини беланцета претретирани у ултразвучном купатилу. Стога је, према наведеним позитивним резултатима, неопходно у наредној фази истраживања испитати цитотоксични ефекат ових узорака на пролиферацију мезенхималних матичних ћелија, што је од изузетне важности за формулисање функционално активних пептида/протеина садржаних у финалном дијететском производу.

### **7.5.2. Утицај састава и величине пептида на пролиферацију мезенхималних матичних ћелија изолованих из перидонталног лигамента**

Антипролиферативни ефекат ултразвучно претретираних узорака хидролизата и/или фракција пептида протеина беланцета, у контексту њиховог цитотоксичног деловања на ћелије здравих донора, испитан је на мезенхималним матичним ћелијама изолованим из перидонталног лигамента, PDLSCs. Ове ћелије су током 24, 48 и 72 часа инкубиране са испитиваним узорцима различите концентрације добијених разблаживањем основних концентрација два хидролизата и две фракције пептида молекуске масе 3-10 kDa са медијумом у односима 1:5, 1:10, 1:50 и 1:100, а као контрола коришћен је сам стандардни медијум за култивацију ћелија-DMEM. И у овом случају, тестирана је негативна контрола, нативно нетретирано беланце. Ради поређења хидролизата протеина беланцета претретираних различитим третманима и утврђивање дејства тих претретмана, као контролни хидролизат тестиран је хидролизат протеина беланцета термички претретираних.

Добијени резултати инхибиције пролиферације матичних мезенхималних ћелија изражени као средње вредности процента вијабилности  $\pm$  стандардна грешка и нормализоване у односу на контролу, графички су илустровани на Слици 7.24.



**Слика 7.24.** Утицај састава и врсте пептида из смеше хидролизата протеина и фракција пептида протеина беланцета претретираних ултразвучним таласима на пролиферацију мезенхималних матичних ћелија перидонталног лигамента, PDLSCs, током 24 часа (а), 48 часа (б) и 72 часа (в) инкубације. Значајне разлике у резултатима су узете у обзир при следећим вредностима вероватноће:  $^a p < 0,001$ ,  $^b p < 0,01$ ,  $^c p < 0,05$ . г) Морфолошке промене на мезенхималних матичних ћелија изоловане из перидонталног лигамента током 72 сата под дејством протеинских хидролизата претретираних ултразвуком фреквенце  $40 \pm 8$  kHz и/или термички (увечање приликом сликања 400x; види Прилог 1).

Приказани резултати са Сlike 7.24 показују да протеински хидролизати и изоловане фракције пептида молекулске масе 3-10 kDa узорака ултразвучно претретираних протеина беланцета испољавају уобичајну цитотоксичну активност према мезенхималним матичним ћелијама перидонталног лигаментa, PDLSCs. Конкретно, у одабраном распону концентрације пептида током 24 сата инкубације хидролизата ултразвучно претираних протеина беланцета и њихове изоловане фракције пептида не испољавају статистички значајан ( $p < 0,01$ ) инхибиторни ефекат на пролиферацију примарних PDLSCs ћелија у МТТ тесту. По истеку времена инкубације од 48 сата евидентна је незнатна промена цитотоксичног ефекта, најпре услед изложености ћелија PDLSCs узорку нативног нетретираног беланцета, што је довело до смањења пролиферације матичних ћелија од свега пар процената. Међутим, позитиван утицај концентрације пептида је уочљив и може се истаћи да се повећањем концентрације инхибиторни ефекат смањује. Такође, постепено повећање цитотоксичног ефекта продужењем времена инкубације на 48 сати забележено је после примене хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,02$  kHz, али је сличан инхибиторни ефекат запажен и инкубирањем примарних матичних ћелија са пептидном фракцијом (3-10 kDa) изолованом из овог хидролизата. Након 72 сата инкубације, резултати се суштински разликују, јер су протеински хидролизат претретираних узорака ултразвучном сондом, концентрације  $3,50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  ( $p < 0,01$ ), и протеински хидролизат претретираних узорака у ултразвучном купатилу, испитан у опсегу концентрација  $1,75\text{-}35,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  ( $p < 0,05$ ), значајно повећали стопу раста матичних ћелија. Остали тестирани узорци иако нису подстакли раст ћелија, нису имали ни токсични ефекат на крају последњег инкубационог времена.

Литературни резултати налик дискутовним резултатима са Сlike 7.24 приказани су у студији испитивања биолошких активности протеина из отпада алги при чему изоловане пептидне фракције нису токсично деловале на раст фибробласта, ћелија плућа WI-38.<sup>365</sup> Такође, резултати у оквиру овог истраживања у сагласности су са објављеним резултатима који истичу да је деловањем пептида из ултрафилтрационих фракција у распону концентрација  $2\text{-}100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  проценат вијабилности ћелијске линије Vero повећан на 98%.<sup>366</sup> Цитотоксичан ефекат на пролиферацију ћелијске линије Vero није испољио ни протеински хидролизат

остриге (*Saccostrea cucullata*), док је цитотоксично деловао на раст ћелијске линије аденокарцинома дебелог црева HT-29.<sup>65</sup>

Генерално, могуће је закључити да у одабраном распону концентрација и времена инкубације оба ензимска хидролизата ултразвучно претретираних протеина беланцета и њихове фракције пептида молекулске масе 3-10 kDa не испољавају инхибиторни ефекат на пролиферацију мезенхималних матичних PDLSC ћелија, што указује да анализирани узорци пептида, како у смеси, тако и у облику фракција немају токсичан ефекат на здраве матичне ћелије. Узимајући у обзир и постигнуте резултате на туморским ћелијама из одељка 7.5.1 закључује се да показани антипролиферативни ефекат анализираних узорка пептида беланцета зависи од типа туморске ћелијске линије и примењене концентрације пептида. Са друге стране, анализирано одсуство токсичних ефеката на матичне ћелије упућује на неопходност даљих испитивања потенцијалног антитуморског деловања ензимских хидролизата богатих ди- и олигопептидима, као и пептидних фракција тих хидролизата. Свеобухватним тумачењем досадашњих резултата из потпоглавља 7.1, 7.2 и 7.3, изводи се уопштен закључак да одређена комбинација ултразвука као претретмана ензимске хидролизе и врсте ендо-пептидазе доводи до ослобађања пептида из нативних протеина беланцета и то пептида који испољавају антирадикалско и антитуморско дејство.

### **7.5.3. Корелација између антиоксидативне и антипролиферативне активности**

Како су применом одговарајућег ултразвучног претретмана, фреквенце  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz, и контролисаном и селективном ензимском хидролизом добијени биоактивни пептиди, у облику протеинских хидролизата и изолованих ултрафилтрационих фракција пептида (3-10 kDa), који истовремено поседују две биолошке активности, антиоксидативну и антитуморску, приступило се утврђивању корелације између наведених својстава и састава пептида. Конкретно, у овај фази истраживања покушано је да се успостави корелација између способности неутралисања ABTS<sup>•+</sup> радикалног катјона и способности инхибиције раста ћелијских линија аденокарцинома MCF-7 и SW480, узимајући том приликом у обзир структуру и дужину секвенце пептида (ди-, три- и олигопептиди). Успостављање корелације извршено је применом линеарне регресије, пошто се утврдило да се ради

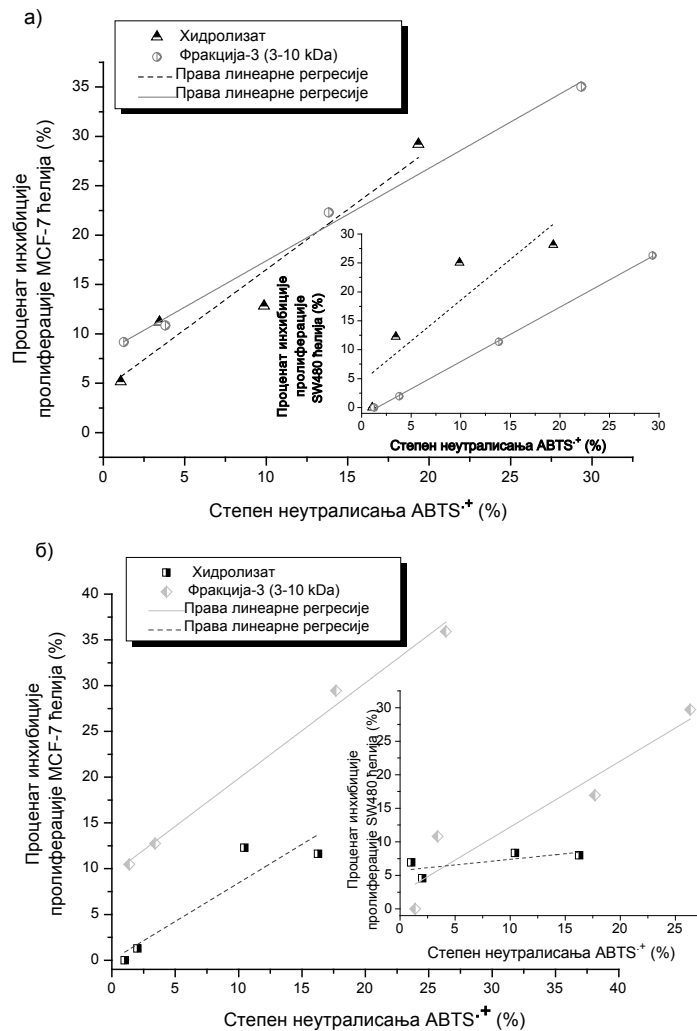


о линеарној корелацији која је овом приликом описана Пирсоновим коефицијентом. Вредности Пирсоновог коефицијента корелације резимирани су у Табели 7.7, док је корелација описана линеарном регресијом графички приказана на Слици 7.25.

**Табела 7.7.** Вредности коефицијената Пирсонове колерације између антиоксидативне и антипролиферативне активности.

Коефицијент Пирсонове корелације <sup>a</sup>		
	МСF-7 ћелијска линија	SW480 ћелијска линија
УС-20 кHz – хидролизат	0,965*	0,892
УС-20 кHz – фракција-3 (3-10 kDa)	0,997**	0,999**
УК-40 кHz – хидролизат	0,930	0,713
УК-40 кHz – фракција-3 (3-10 kDa)	0,996**	0,944*

<sup>a</sup> Вредности коефицијената Пирсонове колерације између антипролиферативне и антоксидативне активности;  
\* сигнификантна разлика са нивом значајности  $p < 0,05$ ;  
\*\* сигнификантна разлика са нивом значајности  $p < 0,01$ .



**Слика 7.25.** Корелациона анализа антиоксидативне активности са аспекта неутрализације ABTS<sup>•+</sup> радикалног катјона и антипролиферативне активности ћелијских линија аденокарцинома MCF-7 и SW480 пептида изолованих из узорка протеина беланцета претретираних: а) ултразвучном сондом фреквенце 20±0,2 kHz и б) у ултразвучном купатилу фреквенце 40±2 kHz.

Резултати са Сlike 7.25 и из Табеле 7.7 јасно показују да је Пирсоновом корелационом анализом утврђена значајна корелација између антиоксидативне и антипролиферативне активности узорка хидролизата протеина беланцета претретираних различитом врстом ултразвука и/или њихових изолованих фракција пептида молекулске масе 3-10 kDa. Најпре, евидентно да је успостављена веома јака линеарна корелација ( $R_2 > 0,860$ ,  $p < 0,05$ ) између вредности степена неутралисања ABTS<sup>•+</sup> радикалног катјона и способности инхибиције раста ћелијских линија аденокарцинома дојке, MCF-7, за сваки анализиран узорак пептида. Способност неутралисања ABTS<sup>•+</sup> радикалног катјона приликом тестирања узорка пептида из

смеше хидролизата протеина претретираних ултразвуком фреквенце  $20\pm 0,2$  и  $40\pm 2$  kHz, није била у линеарној корелацији са степеном инхибиције раста ћелијских линија колоректалног аденокарцинома, SW480 ( $R_2 = 0,693$  и  $0,796$ , редом;  $p > 0,05$ ). Одсуство позитивне линеарне корелације у овом случају описано је и вредностима Пирсонових коефицијената (Табела 7.7) на основу којих је уочљиво одсуство анализираних корелације ( $0,892$ ,  $p > 0,05$  и  $0,714$ ,  $p > 0,05$ , редом за хидролизат УС-20 kHz и хидролизат УК-40 kHz). Вредности коефицијената Пирсонове корелације између инхибиције пролиферације туморских ћелијских линија MCF-7 и SW480 и антирадикалске активности за узорак пептида из фракције-3 (УС-20 kHz) износиле су  $0,997$  и  $0,999$ , редом ( $p < 0,01$ ). Наведеним вредностима доказана је веома сигнификантна позитивна корелација чиме је утврђено да се са порастом степена неутралисања ABTS<sup>•+</sup> радикаског катјона, тј. антирадикалске активности изолованих фракција пептида повећава проценат инхибиције пролиферације ћелијских линија аденокарцинома MCF-7 и SW480. Успостављена корелација између инхибиције пролиферације туморских ћелијских линија MCF-7 и SW480 и антирадикалске активности за фракцију пептида изоловану из хидролизата УК-40 kHz описана је коефицијентима чије су израчунате вредности ( $0,996$ ,  $p < 0,01$  и  $0,944$ ,  $p < 0,05$ , редом) нешто ниже од оних које одговарају фракцији пептида изоловане из хидролизата УС-20 kHz, али јој се ипак може приписати висока значајност. Приказани резултати у потпуности су у сагласности са литературним резултатима према којима фракција пептида молекулске масе мање од 3 kDa, изолована из хидролизата рибљих протеина, са највишом антиоксидативном активношћу испољава највећи инхибиторни ефекат на раст туморских ћелија.<sup>3</sup> Такође, иста корелација је успостављена између антиоксидативне и антипролиферативне активности фракција пептида из протеинских хидролизата отпада алги.<sup>365</sup> И са резултатима других студија уочена је идентична подударност, при чему је изведен закључак да већа активност антиоксидативних суплемената доводи до боље антипролиферативне активности и предложено је да такви антиоксиданти могу утицати на спречавање и лечење болести узрокованих слободним радикалима, нарочито неким облицима канцера.<sup>367-368</sup>

Евидентно је да је Пирсонова корелациона анализа показала значајну позитивну корелацију антипролиферативне активности фракција пептида молекулске масе 3-10 kDa, изолованих из хидролизата протеина беланцета соницираних ултразвуком фреквенце  $20\pm 0,2$  и  $40\pm 2$  kHz, у случају обе туморске

ћелијске линије, са њиховом антиоксидативном активношћу. Наведено подразумева да је за висок степен инхибиције пролиферације ћелија аденокарцинома дојке и колоректалног аденокарцинома неопходно присуство пептида који уједно испољавају и високу антирадикалску активност, а повезаност слободних радикала и оксидативног страса ћелија са пролиферацијом туморских ћелија је велика. Наиме, ендогено створене реактивне врсте кисеоника и азота у интеракцијама са редокс системом ћелија представљају основу регулације молекуларно-физиолошких функција у организму (међу- и унутар-ћелијска сигнализација, ћелијска пролиферација и диференцијација), цитопротективних механизма (инфламација, одбрана од микроорганизама), али и патофизиолошких феномена (старење, канцерогенеза, апоптоза, некроза). Стога, пептиди протеина беланцета могу да заштите здраве ћелије од оксидативног стреса способношћу „хватања“ слободних радикала, па се може претпоставити да баш зато могу послужити као антитуморска средства.

Утврђена корелација између структуре и дужине секвенце пептида протеина беланцета и антиоксидативне активности исказане преко способности инхибиције слободних радикала, генерално показује да је тачно дефинисан ниво структуре пептида, који се највероватније огледа у деловима ди-, три- и олигопептида у распону молекулских маса од 3 до 10 kDa, неопходан за њихово токсично деловање на пролиферацију туморских ћелијских линија. На овај начин, добијен је додатни увид у механизам антиоксидативног и антипролиферативног деловања пептида протеина беланцета и међусобну корелацију. Осим тога, резултати истраживања у оквиру ове дисертације указују на неопходност спровођења клиничких студија на фракцијама пептида молекулске масе 3-10 kDa, а извршена идентификација и карактеризација специфичних пептида протеина беланцета са антипролиферативном активношћу може бити драгоцен фаза истраживања. Са тренутног аспекта, могуће је предложити и истраживања која ће се усмерити на идентификацију механизма којима се услед деловања пептида инхибира пролиферација туморских ћелија, а познато је да се инхибиција може остварити: посредством протеолитичке активности,<sup>367</sup> слабљењем туморске ангиогенезе,<sup>369</sup> спречавањем ћелијског циклуса,<sup>370</sup> индуковањем апоптозе<sup>371</sup> или имуностимулацијом.<sup>365, 372</sup>

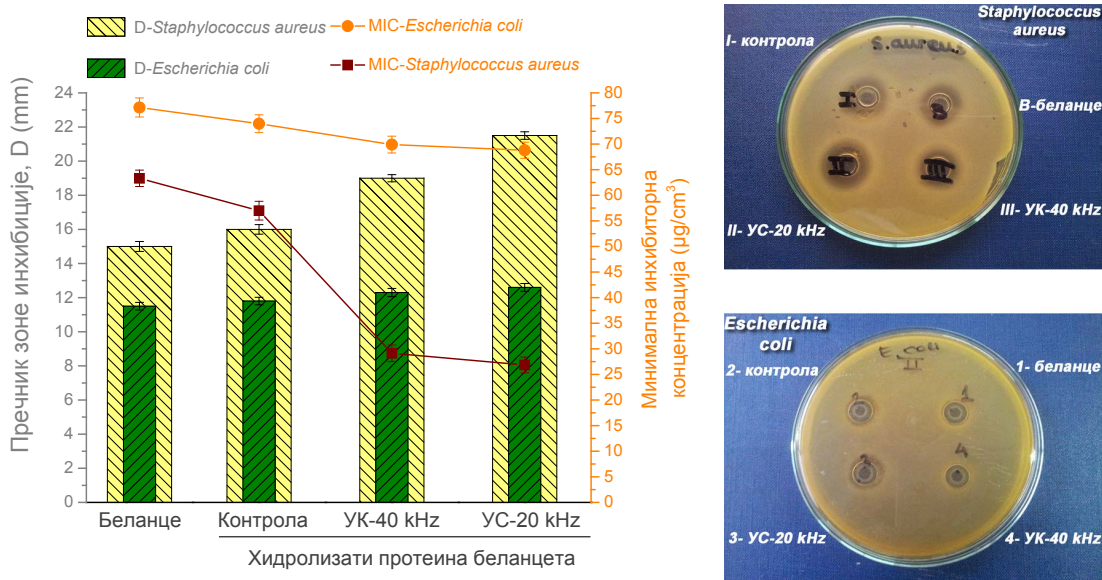
## 7.6. АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ ИЗЛОВЕНИХ ФРАКЦИЈА ПЕПТИДА ИЗ НАТИВНИХ ПРОТЕИНА БЕЛАНЦЕТА

Услед све веће резистенције бактерија на конзервансе хране, али и потенцијалних токсичних ефеката коришћених конзерванаса, антимикробни пептиди појављују се као нова и изузетно повољна алтернатива са аспекта примене, а све у циљу елиминисања наведених нежељених својстава. Велики број антимикробних пептида идентификован је из протеина и/или протеинских фракција различитог порекла, при чему се као најважнији издвајају они пептиди добијени из протеинских хидролизата.<sup>373</sup> Стога, изоловање и пречишћавање антимикробних пептида од суштинског је значаја за испитивање њихових карактеристика и евентуалне примене, али је њихова идентификација из узорака комплексног састава, као што су поротеински хидролизати, врло често изазов. Механизам антимикробног деловања пептида још увек није детаљано утврђен, али се претпоставља да услед лизирања ћелијских мембрана узрокованим директним реаговањем ћелија са антимикробним пептидима долази до бактеријске смрти.<sup>374</sup> Многобројна истраживања, последњих година, везана за антимикробна својства, фокусирана су и усмерена пре свега на оне антимикробне пептиде који се могу произвести током дигестије прехранбених протеина у гастроинтестиналном тракту. Тако су антимикробни пептиди ослобођени након дигестије протеинских фракција протеина беланцета као што су овотрансферин,<sup>375</sup> овалбумин<sup>10</sup> и лизозим.<sup>9, 209, 376</sup> Такође, из ових протеинских фракција селективном и контролисаном ензимском хидролизом изоловани су биолошки активни пептиди који уједно испољавају и антибактеријско деловање према Грам-позитивним и Грам-негативним бактеријама.<sup>8</sup> Прегледом доступних научних студија, може се рећи да већина протеина беланцета поседују антимикробна својства и/или тачно дефинисане физиолошке функције којима се инхибира раст одговарајућих инвазивних микроорганизама.

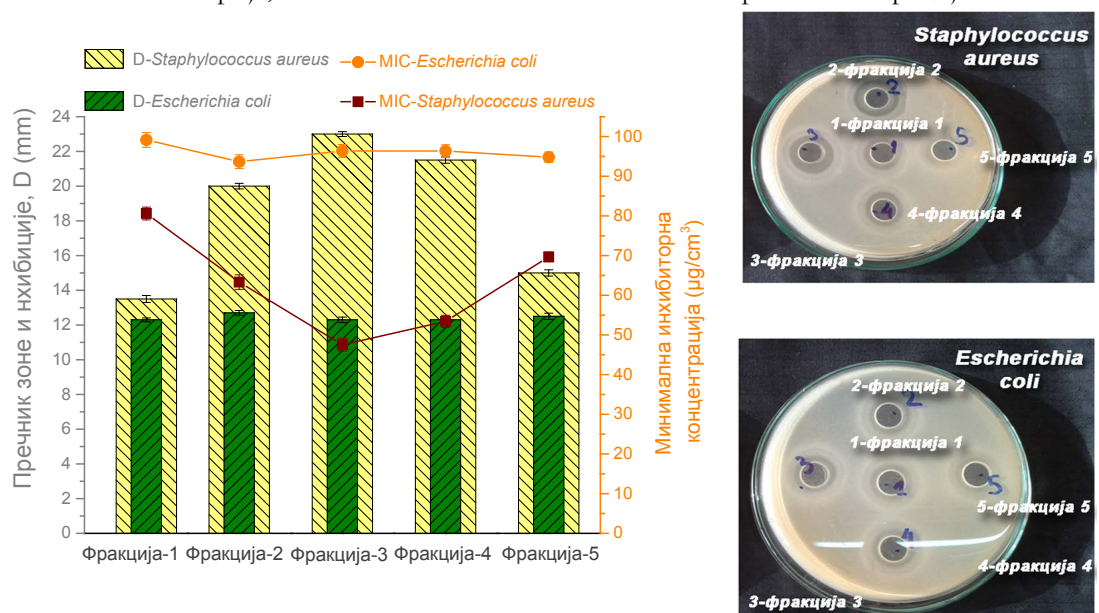
Још увек није идентификован довољан број биоактивних пептида који настају хидролизом нативних протеина беланцета, а поседују поред претходно анализаних биолошких својстава у оквиру ове докторске дисертације, антиоксидативна и антипролиферативна, и антимикробну активност. Нарочито није проучен утицај ултразвучног претретмана на профил пептида и њихову антимикробну активност, а још није потврђено да ли сам хидролизат нативних протеина беланцета добијен под

одређеним условима показује антимикуробну активност, што би било од значаја јер би као такав имао већу нутритивну вредност него литературно описани хидролизати изолованих појединачних протеинских фракција беланцета.

У овој фази истраживања најпре је испитана антимикуробна активност хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвуком фреквенци  $20\pm 0,2$  и  $40\pm 2$  kHz и термичким претретманом, стандардним *in vitro* тестом – методом дифузије на агарној подлози. Бујон дилуционом методом одређена је минимална инхибиторна концентрација (МИС) сваког анализираног протеинског хидролизата. Потом, антимикуробна активност одређена је и за све фракције пептида изоловане из хидролизата протеина беланцета са најизраженијим антимикуробним дејством. Микробиолошки тестови спроведени су на Грам-позитивним *S. aureus* ATCC 25923, Грам-негативним *E. coli* ATCC 25922 стандардизованим културама бактерија и квасаца *C. albicans* ATCC 24433. Квалитативно и квантитативно, антимикуробна активност хидролизата протеина беланцета изражена је дефинисањем ширине зоне инхибиције као пречника бистре зоне на агарној подлози, као и МИС вредности (Слика 7.26, Прилог 3). Као позитивна контрола коришћен је стандардни комерцијални антибиотик широког спектра деловања, неомицин. У сврху испитивања утицаја различите врсте претретмана протеина беланцета на антимикуробну активност, хидролизат нативних нетретираних протеина беланцета анализиран је као негатива контрола (на Слици 7.26 обележено са *контрола*). Антимикуробна активност воденог 10% раствора нетретираних нативних беланцета (на Слици 7.26 обележено са *беланце*) је анализирана зарад добијања информација о утицају ензимске хидролизе на бактеријске сојеве. Ради прегледности, бројчане вредности добијених резултата сумиране су и у Табели 7.8. Резултати пречника зоне инхибиције и минималне инхибиторне концентрације представљају просечну вредност три индивидуална мерења.



**Слика 7.26.** Антимикробна активност хидролизата протеина беланцета, претретираних ултразвучним таласима фреквенци  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz, изражена са аспекта пречника зоне инхибиције Грам-позитивне *S. aureus* и Грам-негативне *E. coli* стандардизоване културе бактерија, као и са аспекта минималне инхибиторне концентрације.



**Слика 7.27.** Антимикробна активност фракција пептида изолованих из хидролизата протеина беланцета, претретираних ултразвучним таласима фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz, изражена са аспекта пречника зоне инхибиције Грам-позитивне *S. aureus* и Грам-негативне *E. coli* стандардизоване културе бактерија, као и са аспекта минималне инхибиторне концентрације.

**Табела 2.8.** Вредности пречника зоне инхибиције,  $D$  (mm) очитане са Петри шоља током спровођења антимикуробног теста заснованог на дифузији узорака кроз агарни медијум.

Микробиолошки сојеви	Пречник зоне инхибиције, $D$ (mm)				
	Беланце	Контрола	УС-20 kHz	УК-40 kHz	75 °C-30 min
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15,0±0,29	16,0±0,28 <sup>a</sup>	21,5±0,22 <sup>b</sup>	19,0±0,21 <sup>b</sup>	19,0±0,15 <sup>b</sup>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11,5±0,22	11,8±0,22 <sup>a</sup>	12,6±0,23 <sup>a</sup>	12,3±0,24 <sup>a</sup>	12,3±0,14 <sup>a</sup>
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	НА	НА	НА	НА	НА
Микробиолошки сојеви	Пречник зоне инхибиције, $D$ (mm)				
	Фракција-1	Фракција-2	Фракција-3	Фракција-4	Фракција-5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13,5±0,20 <sup>a</sup>	20,0±0,16 <sup>b</sup>	23,0±0,14 <sup>b</sup>	21,5±0,18 <sup>b</sup>	15,0±0,18 <sup>a</sup>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12,3±0,11 <sup>b</sup>	12,7±0,14 <sup>b</sup>	12,3±0,16 <sup>a</sup>	12,3±0,16 <sup>a</sup>	12,5±0,18 <sup>a</sup>
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	НА	НА	НА	НА	НА

<sup>a</sup> нема статистички значајне разлике између узорака пептида и нативног беланца ( $p > 0,05$ );

<sup>b</sup> статистички значајна разлика између узорака пептида и нативног беланца ( $p < 0,05$ );

Зоне инхибиције за неомицин биле су 14,1±0,19 и 16,4±0,12 mm за бактеријске сојеви *E. coli* и *S. aureus*, редом;

НА - нема инхибиторне активности и/или нису видљиве зоне инхибиције.

Резултати антимикуробне активности анализирани методом дифузије кроз агарну подлогу (Слика 7.26) за узорке хидролизата протеина беланца претретираних различитом врстом третмана, показују да протеински хидролизати, као и нативно беланце остварују значајно антибактеријско дејство према Грам-позитивним и Грам-негативним бактеријским врстама, *S. aureus* и *E. coli*, редом. Насупрот антибактеријском дејству, протеини беланца у облику хидролизата и/или нативних протеина нису испољили инхибиторну активност на раст ћелијске културе квасца *C. albicans* (Табела 7.8). С тим у вези, као што је приказно у Табели 7.8



антимикробна активност, односно пречних зоне инхибиције раста бактеријске културе *S. aureus* анализираних хидролизата претретираних протеина већи је од вредности очитане за стандардни антибиотик широког спектра деловања, неомицин у концентрацији  $0,35 \text{ mg/cm}^3$  ( $16,4 \pm 0,12 \text{ mm}$ ), док су вредности нативног беланцета и хидролизата протеина без претретмана статистички значајно мање ( $p < 0,05$ ). Детектована инхибиторна активност раста бактеријске културе *E. coli* хидролизата и/или нативних протеина беланцета мања је од активности неомицина за који је очитан пречник зоне инхибиције износио  $14,1 \pm 0,19 \text{ mm}$ . Међу анализираним хидролизатима, тј. смешама пептида протеина беланцета који су претходно били изложени дејству ултразвучних таласа фреквенце  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2 \text{ kHz}$  и/или топлоти на високој температури, хидролизат у коме су протеини били изложени ефекту кавитације ( $20 \pm 0,2 \text{ kHz}$ ) поседовао је највећу антибактеријску активност према соју *S. aureus*. Евидентно је да су смеше пептида показале мању инхибиторну активност према Грам-негативној ћелијској културу *E. coli*, али и да међу узорцима хидролизата, као и у поређењу са нативним беланцетом није утврђена значајна разлика ( $p > 0,05$ ). Интересантно је да је заправо хидролизат протеина соницираних ултразвучном сондом, који је током претходних анализирања биолошких својстава поседовао веће антиоксидативне и антипролиферативне активности наспрам других хидролизата, показао најзначајнију инхибиторну активност према Грам-позитивној *S. aureus*. Овакво запажање резултат је најинтензивнијег деловања претретмана услед кавитације на унутрашње пептидне везе протеина беланцета, а субсеквентном контролисаном ензимском хидролизом на прозводњу олигопептида специфичне секвенце и редоследа аминокиселина, али носиоца биолошких активности.

Минималне инхибиторне концентрације хидролизата протеина третираних ултразвучном сондом износиле су  $26,85 \pm 1,53$  и  $48,79 \pm 1,64 \text{ } \mu\text{g/cm}^3$  према сојевима *S. aureus* и *E. coli*, редом. У поређењу са нетретираним нативним беланцетом наведене МПС вредности хидролизата УС-20 kHz мање су приближно 3 и 1,5 пута, редом за наведене сојеве. Међусобним поређењем узорака са ултразвучним третманом запажа се минорна разлика у корист хидролизата УС-20 kHz. Третман ултразвучном сондом и накнадна ензимска хидролиза у поређењу са високом температуром испољили су већи инхибиторни ефекат на раст *S. aureus*, што се управо може приписати негативном ефекту изузетно агресивног термичког третмана на протеине и/или пептиде.

Прегледом доступне литературе мало је података о антимикуробној активности хидролизата протеина беланцета као смеше пептида ослобођених током ензимске хидролизе, али неколико студија приказало је значајну антимикуробну активност хидролизата протеинских фракција беланцета. Конкретно, хидролизати протеинске фракције овалбумина припремљени у реакцији једностепене ензимске хидролизе употребом трипсина,  $\alpha$ -химотрипсина, пепсина и панкреатина деловали су антимикуробно на 24 тестирана микробиолошка соја, при чему је чак код 20 присуством хидролизата овалбумина активирана аутолиза сојева. Међу протеолитичким ензимима, највећа антимикуробна активност ооварена је хидролизом овалбумина трипсином, а најмања панкреатином, док је редослед опадања аминтикуробне активности приказан на следећи начин: трипсин хидролизат > пепсин хидролизат >  $\alpha$ -химотрипсин хидролизат > панкреатин хидролизат.<sup>377</sup> Истраживачи истичу да је способност стимулисања аутокатализе микробиолошких сојева вероватно један од главних принципа деловања протеинских хидролизата. Упркос великој разноликости, већина антимикуробних пептида директно инхибиторно делује на микробиолошке сојеве кроз механизам који укључује дисрупцију, тј. општећење ћелијске мембране и формирање пора, што омогућава рефлукс есенцијалних јона и хранљивих материја, па последично долази до аутокатализе ћелије. Механизам пермеабилности мембране може се разликовати за различите пептиде у зависности од више параметара, као што су секвенца аминокиселина, састава липида који чине грађу мембране и концентрације пептида.<sup>378</sup> Међутим, иако није потпуно јасан механизам којим се пептиди повезују и мењају пермеабилност мембране микробиолошких ћелија, претпоставља се да се пептиди везују за цитоплазматичну мембрану, стварајући агрегате попут мицела, што доводи до општећења. Иницијална интеракција између пептида и ћелијске мембране, како основна, омогућаје улазак пептида у ћелују и њихово везивање за интрацелуларне молекуле, што последично доводи до инхибиције биосинтезе ћелијског зида, ДНК, РНК и протеина.<sup>379</sup>

Када су у питању нативни протеини беланцета, издваја се студија у којој је испитана антимикуробна активност метилованих нативних протеина. Наиме, нативно беланце са високим садржајем киселих аминокиселина (изоелектрична тачка  $pI \sim 4,8$ ) и хидрофилне природе трансформисани су у метиловане деривате у којима је израженији базни карактер ( $pI \sim 8,0$ ) и хидрофобност. Такви узорци нативних

протеина беланцета коришћени су у антибактеријском тесту на раст шест Грам-позитивних и четири Грам-негативних патогених бактеријских сојева, где су се вредности минималних инхибиторних концентрација кретале у опсегу 0,5-1,0  $\mu\text{g}$ /дису, што је одговрало или чак било веће од вредности компаративних специфичних антибиотика (1-7,5  $\mu\text{g}$ /дису).<sup>380</sup> У води растворљива смеша пептида, односно хидролизат протеинске фракције беланцета лизозима показао је значајну антибактеријску активност према Грам-позитивном *Staphylococcus aureus* 23-394 и Грам-негативном *Escherichia coli* К-12 бактеријском соју.<sup>9</sup> О антимикумној активности протеинских фракција беланцета као што су овотрансферин, цистатин, лизозим, коновалбумин више је речи било у потпоглављу 3.2, тако да је сасвим довољно напоменути да су остварени резултати у овој фази истраживања идентични или чак и значајно позитивнији када су у питању хидролизати нативних протеина беланцета, пре свега узорци протеина третираних ултразвучном сондом.

Како су протеини беланцета третирани ултразвуком посредством ултразвучне сонде подвргнути субсеквентној ензимској хидролизи са алкалазом, испољили највећу инхибиторну активност раста бактеријских сојева, фракције пептида изоловане из овог хидролизата даље су коришћене. Наиме, за свих пет изолованих фракција спроведени су микробиолошки тестови на Грам-позитивним *S. aureus* АТСС 25923, Грам-негативним *E. coli* АТСС 25922 стандардизованим културама бактерија и квасаца *C. albicans* АТСС 24433, а резултати инхибиције раста ћелијских култура приказани су на Слици 7.27 (Прилог 3) и у Табели 7.8.

На основу резултата представљених у Табели 7.8 и на Слици 7.27 (Прилог 3) може се рећи да све изоловане фракције пептида протеина беланцета добијене након ултрафилтрације хидролизата нативних протеина претходно изложених дејству ултразвучне сонде фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz поседује значајну антибактеријску активност према испитаној Грам-позитивној култури бактерије *S. aureus*, осим фракције-1 која садржи пептиде молекулске масе веће од 30 kDa и за коју је антимикумна активност најмања међу фракцијама. Осим тога, за анализирану фракцију-1, забележена антимикумна активност у вредности зоне инхибиције од свега  $13,5 \pm 0,20$  mm, је значајно мања ( $p < 0,05$ ) наспрам зоне инхибиције нативног беланцета, али и контролног хидролизата без претретмана. Такође, закључује се да су све изоловане пептидне фракције показале слабу инхибиторну активност према испитаном соју *E. coli*, али и да инхибиторна активност на раст ћелија квасца *S.*

*albicans* није примећена. Примећује се да остварени резултати показују интересантан антимикуробни потенцијал раста Грам-позитивне културе *S. aureus*, нарочито фракција-2, фракција-3 и фракција-4 са пептидима молекулске масе 10-30, 3-10 и 1-3 kDa и читаним зонама инхибиције од  $20,0 \pm 0,16$ ,  $23,0 \pm 0,14$  и  $21,5 \pm 0,18$  mm, редом.

Статистичком анализом резултата за Грам-позитивну *S. aureus* утврђена је значајна разлика зоне инхибиције ( $p < 0,05$ ) фракције-3 наспрам полазног хидролизата протеина беланцета, па је очигледно да је фракција-3 са пептидима молекулске масе 3-10 kDa испољила најјачу инхибиторну активност. Поређењем читаних вредности зона инхибиције за Грам-негативну *E. coli*, било међусобно или са полазним хидролизатом, статистички значајна разлика није забележена за фракције пептида ( $p > 0,05$ ). Минимална инхибиторна концентрација пептида фракције-3 потребна за инхибирање раста *S. aureus* and *E. coli*, у оквиру ове дисретације износила је  $47,52 \pm 1,61$  и  $96,36 \pm 1,64$   $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , редом. Неопходно је нагласити да су антибактеријске активности свих фракција пептида према Грам-негативној *E. coli* биле значајно ниже ( $p > 0,05$ ) од антибиотика широког спектра деловања, неомицина, док су најактивније фракције пептида молекулске масе 10-30, 3-10 и 1-3 kDa према Грам-позитивној *S. aureus* испољиле веће зоне инхибиције од неомицина (концентрације  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ). Прегледом доступне литературе, скоро да нема података о антимикуробној активности изолованих ултрафилтрационих фракција хидролизата протеина беланцета, нарочито са аспекта испитивања утицаја претретмана, тако да је поређење резултата отежано. Супротно, у литератури постоји велики број студија који се бави идентификовањем пептида изолованих из хидролизата протеинских фракција беланцета, о којима ће бити речи и са којима ће представљени резултати бити упоређени.

Мине (Mine) и коаутори изоловали су антимикуробне пептиде из хидролизата протеинске фракције лизозима, припремљеног дигестијом са пепсином и трипсином, и идентификовали секвенце изолованих пептида: Ile-Val-Ser-Asp-Gly-Asp-Gly-Met-Asn-Ala-Trp (секвенца одговара аминокиселинским остацима лизозима на позицији 98-108) и His-Gly-Leu-Asp-Asn-Tyr-Arg (секвенца одговара аминокиселинским остацима лизозима на позицији 15-21). Изоловани пептиди са наведеним секвенцама испољили су антибактеријско дејство према бактеријским сојевима *E. coli* K-12 и *S. aureus* 23-394, респективно.<sup>9</sup> Добијеним резултатима истраживачи су утврдили да лизозим поседује неензимске домене у својој примарној

структури који испољавају бактериостатичко деловање, тј. спречавају размножавање бактерија, а да се они могу ослободити протеолитичком хидролизом.<sup>9</sup> Пептиди изоловани из лизозима минималну инхибиторну активност остварили су при концентрацији  $400 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ , док су пептиди протеина беланцета из фракције-3 молекулске масе 3-10 kDa минималну инхибиторну активност према бактеријским сојевима *S. aureus* и *E. coli* остварили при концентрацијама  $47,52 \pm 1,61$  и  $96,36 \pm 1,64 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ , редом. Претпоставља се да су значајно бољи резултати у оквиру ове дисертације, са аспекта минималне инхибиторне концентрације иако су пречници зона инхибиције мањи него код лизозима, оставрени из разлога што је као полазни супстрат коришћено нативно беланце које чини смешу свих протеина беланцета, укључујући и лизозим. Поред тога, нативни протеини беланцета су били подвргнути ултразвуку и субсеквентној ензимској хидролизи, па се претпоставља да је синергистичким деловањем ослобођен већи број пептида са доменима који имају бактериостатичко деловање него што је то случај са протеинском фракцијом лизозима. Пептид изолован протеолитичком дигестијом са пепсином из лизозима Г-типа са идентификованом секвенцом Thr-Ala-Lys-Pro-Glu-Gly-Leu-Ser-Tyr која одговара аминокиселинским остацима лизозима из гушчијег беланцета на позицији 20-28, такође је инхибирао раст бактеријских сојева Грам-позитивне *Staphylococcus epidermidis* и Грам-негативне *Vibrio cholerae*.<sup>376</sup> У још једној студији идентификована је пептидна фракција именована као F2 (молекулске масе  $1753,98 \pm 0,5 \text{ Da}$ ) из хидролизата лизозима, добијеног двостепеном ензимском хидролизом са папаином и трипсином, са минималним концентрацијама инхибиције раста бактеријских сојева *E. coli* и *Leuconostoc mesenteroides* од  $355,64 \pm 2,2$  и  $442,25 \pm 2,8 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ .<sup>209</sup> И из хидролизата других протеинских фракција беланцета, изоловани су пептиди са антимикуробном активношћу, пре чему се поред лизозима издваја и овотрансферин. Тако је установљено да пептид, катјонски фрагмент овотрансферина из беланцета, означен као ОТАР-92 показује снажну бактерицидну активност и према Грам-позитивним и Грам-негативним бактеријским сојевима.<sup>375</sup>

Протеолитичком хидролизом овалбумина користећи трипсин и химотрипсин, из оба хидролизата изолован је и идентификован значајан број антимикуробних пептида који су инхибирали раст микробилошких сојева *B. subtilis* и *C. albicans*, док нехидролизована протеинска фракција беланцета, овалбумин, није испољио ни антибактеријску ни антифунгалну активност. Ова група аутора је истакла да није

пронађена корелација између наелектрисања пептида и антимикуробне активности, али да се зна да је позитивно наелектрисање на рН вредности микробног теста неопходно за постизање антимикуробне активности. Међутим, друге студије су показале да се позитивно наелектрисање пептида сматра веома важним за бактерицидно деловање према Грам-негативним сојевима, који у саставу ћелијске мембране имају негативно наелектрисане липополисахариде.<sup>10</sup> На основу наведене теоријске чињенице, узимајући при томе у обзир представљене резултате из потпоглавља 7.4 и претпоставке да изоловане фракције пептида су хидрофобне, могуће је претпоставити да је управо ова хидрофобност и негативно наелектрисање пептида омогућило интензивно деловање на Грам-позитиван сој *S. aureus*. Тако, још једном је потврђено да су досадашњи резултати у позитивној корелацији са аспекта састава и величине пептида и биолошке активности.

Генерално, антимикуробна активност пептида протеина беланцета у оквиру ове дисертације показује да изоловани пептиди како из хидролизата, тако и из ултрафилтрационих фракција, не поседују инхибиторну активност према ћелијама квасца *C. albicans*, али да испољавају антибактеријску активност, нарочито према патогеној Грам-позитивној *S. aureus* за коју је познато да узрокује тровање храном, као последица конзумирања хране која је загађена ентеротоксинима. Свеобухватно, може се закључити је ултразвучним претретманом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz протеина беланцета и њиховом субсеквентном хидролизом алкалазом, као и применом ултрафилтрације значајно повећана антимикуробна активност у поређењу са нативним нетретираним беланцетом. С тим у вези, може се извести закључак да изоловане фракције пептида молекулске масе 3-10 и 1-3 kDa поседују антибактеријску активност, што се може објаснити следећом претпоставком. Наиме, претпоставља се да пептиди, груписани у оквиру једне фракције тачно дефинисаног састава и величине пептидних секвенци, лакше могу дифундовати кроз ћелијску мембрану Грам-позитивних бактерија у течном медијуму и на тај начин испољити бактериостатичко и/или бактериоцидно дејство. Представљени резултати још указују и на чињеницу да се пептиди беланцета могу сврстати у антимикуробне пептиде, чије се деловање и тачан механизам продирања унутар ћелијске мембране бактерија треба додатно истражити и разјаснити како би се фракције као такве, без даљих скуких и приметних корака пречишћавања могле користити као антимикуробни агенси пре свега у прехранбеним производима, али и у козметичким препаратима због претходно

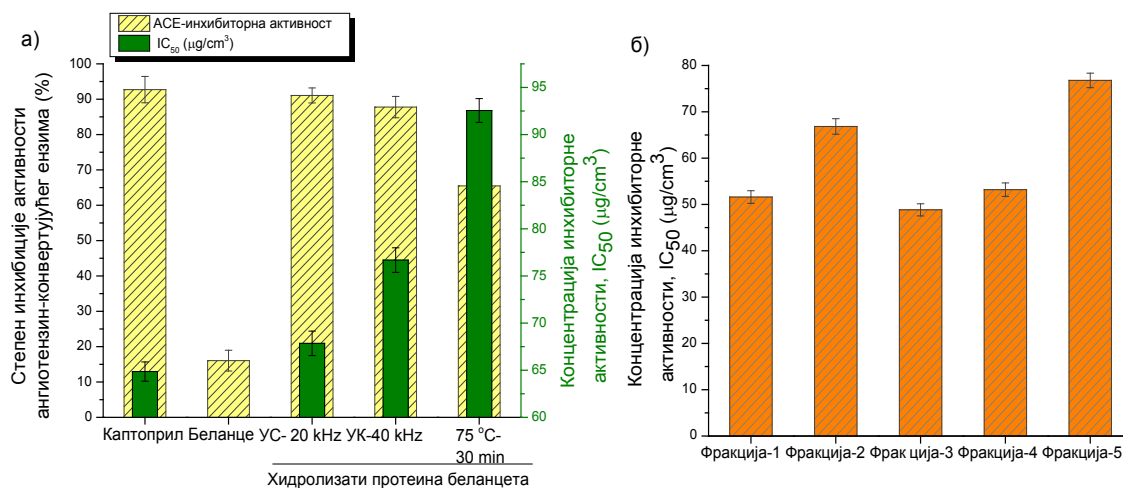
утврђеног антиоксидативног дејства. Потенцијална примена изолованих антимикробних ултрафилтрационих фракција пептида у прехранбеним производима односила би се пре свега на употребу као природних конзерванаса који би спречили микробни раст пре свега Грам-позитивних сојева.

## **7.7. АНТИХИПЕРТЕНЗИТИВНА И АНТИКОАГУЛАТИВНА АКТИВНОСТ ИЗЛОВЕНИХ ФРАКЦИЈА ПЕПТИДА ИЗ НАТИВНИХ ПРОТЕИНА БЕЛАНЦЕТА**

Пептиди биорегулатори чине групу нове генерације лекова, а прегледом доступних литературних података може се изнети чињеница да ови пептиди, изоловани најразличитијим ензимским поступцима из нативних протеина биљног или животињског порекла, са широким спектром деловања, пре свега израженим биолошким активностима, попут антиоксидативне, антимикробне, антивиралне, имуномодулаторне, антипролиферативне, антикоагулативне, антихипертензивне и др., веома су важна категорија како у терапији тако и у превентиви многих обољења. Пептиди протеина беланцета, садржани у изолованим фракцијама, дефинисаног састава у смислу величине (молекулске масе), у досадашњим истраживањима у оквиру ове дисертације показали су значајне и веома важне биолошке активности, испитане *in vitro* методама, попут антипролиферативне активности, антиоксидативне и антимикробне, при чему је успостављена корелација између прве две активности. С обзиром да је биолошко деловање пептидних фракција изузетно побољшано третирањем нативних протеина беланцета ултразвуком високог интензитета и субсеквентном ензимском хидролизом, а како саме фракције пептида без додатних скуних корака пречишћавања поседују задовољавајуће активности, претпоставља се да припадају групи пептида биорегулатора и да могу бити биолошки активан додаток исхрани. С тим у вези, како би се будућа палета могуће употребе проширила у овој фази истраживања додатно су испитана још два веома важна биолошка својства: антихипертензивна и антикоагулативна активност.

Антихипертензивна активност хидролизата и/или изолованих фракција пептида протеина беланцета претретираних ултразвуком фреквенци  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz одређена је *in vitro* спектрофотометријском методом на основу мерења АСЕ-инхибиторне активности коришћењем читача микротитарских плоча, при чему је као супстрат коришћен хипурил-хистидил-леуцин, а као биокатализатор

ангиотензин-конвертујући ензим из плућног ткива зеца. Инхибиторна активност изражена је као концентрација пептида у смеси хидролизата и/или изолованих фракција пептида потребна да се инхибира 50% АСЕ-активности ( $IC_{50}$ ) и добијени резултати графички су представљени на Слици 7.28. Каптоприл, активни инхибитор ензима који конвертује неактивни ангиотензин I у активни облик, ангиотензин II, који се сматра једним од најјачих ендогених вазоконстриктора, коришћен је као стандард (позитивна контрола) за поређење инхибиторне активности (Прилог 3). Утицај ултразвучног претретмана, ензимске хидролизе, састава и величине пептида у овој фази истраживања испитан је и поређењем инхибиторне активности са активношћу воденог 10% раствора нетретираног нативног беланцета (на Слици 7.28 обележено са *беланице*). Такође, како би се и у овом случају анализирао утицај ултразвучног претретмана на АСЕ-инхибиторну активност добијених пептида, резултати су упоређени са активношћу пептида ослобођених током конвенционалног термичког третмана.



**Слика 2.28.** Антихипертензивна активност хидролизата протеина беланцета претретираних различитом врстом третмана (а) и фракција пептида изолованих ултрафилтрацијом хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz (б) изражена преко степена инхибиције АСЕ-активности и концентрације потребне да се инхибира 50% АСЕ-активности ( $IC_{50}$ ).

Графички представљени резултати са Сlike 7.28а јасно показују да сва три анализирана хидролизата протеина беланцета, који чине смеше различитих пептида, при концентрацијама пептида  $1,0 \text{ mg}/\text{cm}^3$  поседују антихипертензивну активност која је у опсегу степена инхибиције од 65,48 до 91,07 %. Добијени експериментални



резултати указују на то да је протеолитичком хидролизом нативних претретираних протеина беланцета чак 4-5,5 пута повећана способност инхибиције АСЕ-активности у поређењу са узорком нативног беланцета ( $16,04 \pm 2,94$  %), чему је највише допринео ултразвучни претретман. Наиме, применом конвенционалног термичког третмана и накнадном хидролизом степен инхибиције АСЕ-активности ослобођених пептида износио је  $65,48 \pm 3,53$  %, док је ултразвучним претретманима фреквенци  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz успешно издвајање пептида, чија је способност инхибиције АСЕ-активности износила  $91,07 \pm 2,12$  и  $87,77 \pm 3,01$  %, редом. Међу резултатима добијених применом различите врсте и фреквенце ултразвучних таласа није забележна статистички значајна разлика ( $p > 0,05$ ) у вредностима степена инхибиторне активности, али је интересантно запажање да је приликом одређивања њихове концентрације потребне за инхибирање 50% АСЕ-активности ( $IC_{50}$ ) забележена и те како значајна разлика ( $p < 0,05$ ).  $IC_{50}$  вредности износиле су  $67,85 \pm 1,29$  и  $76,68 \pm 1,31$   $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  за ултразвучни претретман фреквенце  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz, редом, чиме је утврђено да је ипак знатно неопходна већа концентрација оних пептида ослобођених претретирањем нативних протеина у ултразвучном купатилу. Представљеним резултатима још једном је показано да конвенционални термички претретман протеина, који је изузетно заступљен у индустријској пракси, значајно доприноси смањењу биолошке активности пептида протеина беланцета услед њихове нестабилности и да је потреба за његовом заменом мање инвазивним техникама, као што је технологија ултразвука, сасвим оправдана. Евидентно је да у поређењу са синтетички активним АСЕ-инхибитором каптоприлом концентрације  $0,4$   $\text{mg}/\text{cm}^3$ , хидролизати ултразвучно претретираних протеина концентрације пептида  $1,0$   $\text{mg}/\text{cm}^3$  су остварили идентичан ниво инхибирања АСЕ-активности ( $p > 0,05$ ), као и да међу вредностима  $IC_{50}$  каптоприла и хидролизата протеина претретираних ултразвучном сондом не постоји значајна разлика,  $64,86 \pm 1,02$  и  $67,85 \pm 1,29$   $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , редом.

Идентично овим резултатима, истраживачи су ултразвучним претретманом и субсеквентном хидролизом протеина млека користећи неутразу утицали на повећање антихипертензивне активности, јер је ултразвук потпомогао ослобађање нових пептида малих молекулских маса са израженом активношћу.<sup>381</sup> Међутим, поређењем вредности  $IC_{50}$ , за инхибирање 50% АСЕ-активности потребна је чак 3,4 пута мања концентрација хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвучном

сондом 15 минута, него хидролизата протеина млека. Оптимизовањем биотехнолошког поступка ензимске хидролизе протеина претретираних ултразвучном сондом високог интензитета у циљу изоловања пептида са високим степеном инхибиторне АСЕ-активности, истраживачи су утврдили да време претретмана мање од 10 минута резултира најбољим активностима.<sup>382-383</sup> Нешто дуже време третирања протеина беланцета (15 минута) може се приписати различитости ултразвучне сонде која је коришћена у истраживањима, јер је по свему судећи снага сонде коришћена током експерименталног рада у оквиру ове дисертације мања од упоређених. Хидролизат протеина беланцета, нуспроизвода екстракције лизозима и цистатина из нативног беланцета, припремљен протеолитичком хидролизом са некомерцијалном протеазом изолованом из смокволисне тикве (*Cucurbita ficifolia*), као и пермеат након ултрафилтрације кроз мембране од 30 kDa, испољили су антихипертензивну активност, која је много мања у односу на узорке из ове дисертације. Међутим, најактивније фракције које су изоловане у овој студији имале су скоро идентичне вредности IC<sub>50</sub> (68,7±3,71 и 33,9±1,69 µg) као узорци пептида из хидролизата (УС-20 kHz) у овој дисертацији.<sup>309</sup> Хидролизом сировог беланцета применом различитих протеолитичких ензима и испитивањем утицаја ензима на ослобађање пептида са антихипертензивном активношћу, истраживачи су најактивнији хидролизат добили применом пепсина (IC<sub>50</sub> вредност износила је 55,3 µg/cm<sup>3</sup>), док је фракција пептида молекулске масе мање од 3 kDa испољила још већу инхибиторну активност са вредношћу инхибиторне концентрације IC<sub>50</sub> од 34,5 µg/cm<sup>3</sup>.<sup>95</sup>

Поредећи ове резултате са претходним резултатима антиоксидативне активности из потпоглавља 7.4 може се са сигурношћу рећи да је присуство ди-, три- и олигопептида у хидролизатима ултразвучно претретираних протеина беланцета са високом биолошком активношћу очигледно, али и да се претпостави да је концентрација биоактивних пептида у најактивним фракцијама висока. Стога, антихипертензивна активност анализирана је на изолованим фракцијама пептида из хидролизата протеина претретираних ултразвучном сондом (Слика 7.28б) и из хидролизата протеина претретираних у ултразвучном купатилу (*резултати нису приказани*) и том приликом припремљена је серија разблажења сваке фракције како би се резултати исказали преко IC<sub>50</sub> вредности. Изоловане фракције пептида молекулских маса 3-10 и 1-3 kDa, из хидролизата протеина беланцета претретираних

ултразвучном сондом, испољиле су највеће антихипертензивне активности међу фракцијама са вредностима инхибиторних концентрација,  $IC_{50}$ ,  $48,84 \pm 1,31$  и  $51,59 \pm 1,36 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ , редом. Фракције пептида именоване као фракција-1, фракција-2 и фракција-5 имале су значајно мању АСЕ-инхибиторну активност, не само у поређењу са фракцијама већ и са полазним хидролизатом ( $p < 0,05$ ). Због тога може се истаћи да антихипертензивну активност испољавају управо пептиди беланцета тачно дефинисаног састава и величине, пре свега пептиди мањих молекулских маса за које се може претпоставити да би у *in vivo* тестовима могли лакше да дифундују и остваре већу концентрацију у крви, али и да се управо из фракције-3 и фракције-4 могу изоловати појединачни пептиди (ди-, три- и/или олигопептиди) дефинисане секвенце, на основу које би се ови пептиди могли синтетисати и користити даље у формулацијама. Како су вредности степена инхибиције АСЕ-активности фракција пептида молекулске масе 3-10 и 1-3 kDa из хидролизата протеина беланцета претретираних у ултразвучном купатилу фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz значајно више у поређењу са вредностима фракција из хидролизата протеина третираних ултразвуком веће фреквенце, али мањег интензитета (ултразвучно купатило), може се претпоставити да је овакав резултат последица кавитацијског деловања ултразвучне сонде на структуру протеина беланцета. Конкретно, претпоставља се да је деловањем ултразвучне сонде посредством кавитације дошло до потпуног или делимичног разматавања полипептидних ланаца и већег излагања хидрофобних остатака аминокиселина Phe, Trp и Tyr полипептидног ланца из унутрашњости молекула. Поред тога, с обзиром да је у неким студијама наглашено да се ултразвучним третманом може поспешити ослобађање хидрофобних аминокиселинских остатака, а да је претходним резултатима на основу резултата антиоксидативних активности (потпоглавље 7.4) претпостављено управо ово ослобађање, може се рећи да је и садржај хидрофобних аминокиселина допринео антихипертензивној активности фракције-3 и фракције-4.

У погледу везе између структуре и АСЕ-инхибиторне активности биоактивних пептида, прегледом резултата различитих студија установљено је да пептиди са врло снажном АСЕ-инхибиторном активношћу поседују аминокиселине Pro, Phe или Tyr на С-терминалном крају, док се на N-терминалном крају налазе Val и Ile.<sup>384</sup> У многим студијама изоловани су пептиди са антихипертензивном активношћу и управо оваквом структуром у својој секвенци, као на пример следећи пептиди: Val-Pro-Pro and

Pe-Pro-Pro из хидролизата киселог млека,<sup>385</sup> Pe-Ala-Pro из хидролизата пшеничног глиадина,<sup>386</sup> Val-Pe-Tyr из хидролизата беле морске рибе,<sup>387</sup> Ala-Pro и Val-Arg из хидролизата коже лососа,<sup>388</sup> Tyr-Ala-Pro и Val-Pe-Pe из хидролизата сипе<sup>389</sup> и Gly-Ala-Gly-Pro из хидролизата птичијег мишића.<sup>390</sup> Поред наведеног, познато је да се пептиди краћег полипептидног ланца брже апсорбују и постижу већу концентрацију у крви него појединачне аминокиселине и пептиди дужих полипептидних ланаца, као и да Pro игра важну улогу у стабилизовању пептида са АСЕ-инхибиторним дејством. Студије су показале да инхибиторни пептиди који садрже остатке пролина, пре свега на С-терминалном крају, су отпорнији на деградацију дигестивним ензимима.<sup>390</sup>

Прегледом многобројних студија на тему антихипертензивних пептида изолованих из различитих протеина, запажена су два, најбоље окарактерисана пептида изолована из протеина беланцета. Реч је о: 1) овокинину, октапептиду са секвенцом Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu изолованом из хидролизата протеинске фракције овалбумина (хидролизат припремљен коришћењем пепсина) и 2) хексапептиду (пептид са секвенцом која одговара аминокиселинама овокинина на позицији 2-7, тзв. овокинин (2-7)) добијен дигестијом овалбумина користећи химотрипсин. Интересантно је да су заменом фенилаланина триптофаном на С-терминалном крају у секвенци овокинина (2-7) истраживачи значајно побољшали антихипертензивну активност овог хексапептида.<sup>309, 391</sup> Два нова тетрапептида изолована из хидролизата протеина беланцета, нуспроизвода, са секвенцама Ser-Trp-Val-Glu (секвенца одговара аминокиселинама овалбумина на позицији 148-151) и Asp-Pe-Leu-Asn (секвенца одговара аминокиселинама овалбумина на позицији 86-89) показала су снажну антихипертензивну активност која је са аспекта IC<sub>50</sub> вредности износила 33,88 и 73,44 µg, редом.<sup>309</sup> Из протеина беланцета претретираних високом температуром истраживачи су након хидролизе алкалазом изоловали биоактивни пептид секвенце Arg-Val-Pro-Ser-Leu са високом вредношћу инхибиције АСЕ-активности коју су истраживачи описали IC<sub>50</sub> вредношћу од 20 µM.<sup>353</sup> Такође, хидролизом сировог беланцета пепсином и изоловањем чак девет фракција, најзначајнија антихипертензивна активност (IC<sub>50</sub> < 40 µg/cm<sup>3</sup>) измерена је код чак три фракције из којих су идентификоване две нове секвенце пептида са АСЕ-инхибиторном активношћу: Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu (IC<sub>50</sub> = 6,2 µM) и Tyr-Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Pe-Leu (IC<sub>50</sub> = 4,7 µM).<sup>95</sup> На основу резултата истраживања о

АСЕ-активности овокинина истраживачи су претпоставили да пептиди изоловани из беленцета са одређеним степеном АСЕ-инхибиторне активности морају у својој секвенци на С-терминалном крају имати Leu.<sup>392</sup> Значајно мању АСЕ-инхибиторну активност показао је пептид са секвенцом Lys-Val-ArgGlu-Gly-Thr-Thr-Tyr изолован из овотрансферина ( $IC_{50}=102,8 \mu M$ ).<sup>393</sup> Из хидролизата лизозима, након ултрафилтрације кроз мембрану величине пора 3 kDa и даљим раздвајањем изолован је пептид секвенце Phe-Glu-Ser-Asn-Phe-Asn-Thr-Gln-Ala-Thr-Asn-Arg и молекулске масе 1428,6 Da, који је окарактерисан као некомпетитивни инхибитор ангиотензин-конвертујућег ензима са вредношћу  $IC_{50} 0,03 mg/cm^3$ .<sup>351</sup>

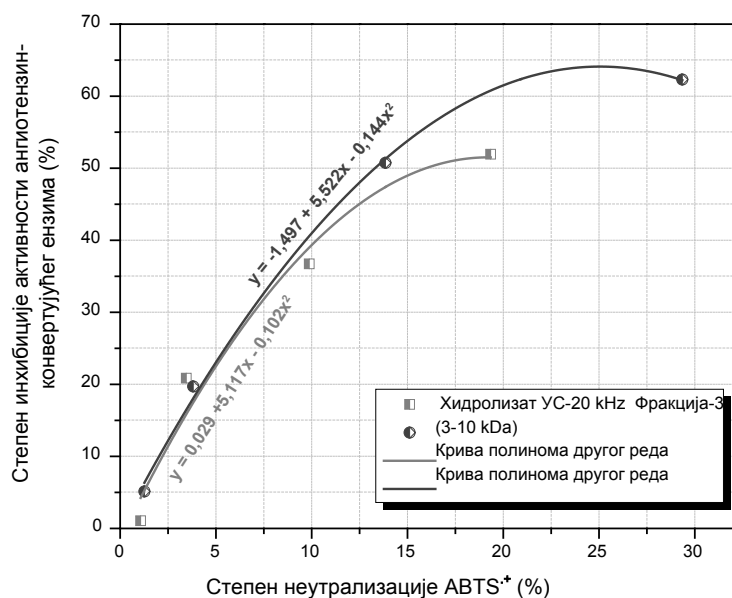
Како је уочљиво и наведено, број изолованих пептида са антихипертензивном активношћу из дана у дан расте, а с обзиром да секвенцирање и тачно одређивање секвенце није био циљ истраживања ове дисертације, у даљим истраживањима треба наставити са изоловањем пептида из најактивних фракција молекулске масе 3-10 и 1-3 kDa. Претпоставља се да се на тај начин додатно може расветлити механизам деловања биоактивних пептида добијених у току истраживања на овој дисертацији, а самим тим и циљано употребити у формулацијама фармацетуских производа, као и развијању оптималног поступка производње АСЕ-инхибиторних пептида из протеина беланцета. Осим тога, разумевање односа између биолошких активности и физичко-хемијских особина хидролизата и/или фракција пептида важно је како би се олакшале развојне сепарационе технологије за припрему фракција са побољшаним биоактивностима.

#### **7.7.1. Корелација између антиоксидативне и антихипертензивне активности**

Биоактивни протеински хидролизати добијени протеолитичком хидролизом нативних прехранбених протеина поседују велики број биолошких активности, као што су антиоксидативна и антихипертензивна активност, због чега привлаче велику пажњу научних студија јер управо ове две биолошке активности играју главне улоге у превенцији кардиоваскуларних обољења. Познато је да при условима високог крвног притиска, ангиотензин II утиче на повећање оксидативног стреса посредством механизма стимулације формирања интрацелуларних реактивних врста кисеоника и активирањем мембранске оксидазе, а на тај начин и на образовање супероксид анјона и водоник-пероксида. Стога, у научним студијама показано је да

осим контроле крвног притиска, фрагменти пептида са АСЕ-инхибиторном активношћу поседују аниоксидативни одбрамбени систем путем инхибиције формирања ангиотензин II.

Како су у оквиру овог истраживања применом ултразвучног претретмана, фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz, и контролисаном и селективном ензимском хидролизом са алкалазом добијени биоактивни пептиди, у облику протеинских хидролизата и изолованих ультрафилтрационих фракција пептида, који истовремено поседују две биолошке активности, антиоксидативну и антихипертензивну, приступило се утврђивању корелације између наведених својстава и састава пептида. Конкретно, покушано је успостављање корелације између способности неутрализације  $ABTS^{+}$  радикаског катјона и способности инхибиције АСЕ-активности, узимајући том приликом у обзир структуру и дужину секвенце пептида (ди-, три- и олигопептиди). Успостављање корелације извршено је применом вишеструке линеарне регресије (полиномална регресија) описана једначином полинома другог реда. Утврђена корелација описана полиномом другог реда графички је приказана на Слици 7.29.



**Слика 7.29.** Корелациона анализа антиоксидативне активности са аспекта неутрализације  $ABTS^{+}$  радикаског катјона и антихипертензивне активности пептида изолованих из узорка протеина беланцета претретених ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz.

Корелација између антиоксидативне и антихипертензивне активности пептида протеина беланцета тестирана је коришћењем полиномалне регресионе анализе. Корелационом анализом приказаној на дијаграму вишеструке линеарне корелације (Слика 7.29) утврђено је да је антихипертензивна активност пептида

протеина беланцета у позитивној и/или директној корелацији са њиховом антиоксидативном активношћу, односно очигледно је да АСЕ-инхибиторна активност пептида код оба анализираних узорка зависи од антиоксидативне активности. Наиме, евидентно је да пептиди протеина беланцета у узорку хидролизата као и у узорку фракције пептида молекулске масе 3-10 kDa са израженом АСЕ-инхибиторном активношћу дају велики допринос антиоксидативној активности. У случају пептида у хидролизату и изолованој фракцији (3-10 kDa) корелација је описана регресионом једначином која је полином другог реда са високим коефицијентима детерминације  $R^2$ , 0,915 и 0,994, редом. С тим у вези, закључује се да повећањем способности неутралисања АВТS<sup>•+</sup> радикалског катјона, способност инхибирања конверзије неактивног ангиотензин I у активни облик ангиотензин II значајно расте ( $p < 0,05$ ), али и да после одређеног нивоа  $\sim 25\%$  незнатно опада што се пре свега може преписати концентрацији пептида која је коришћена. Наиме, за испољавање веће способности неутралисања АВТS<sup>•+</sup> радикалског катјона коришћена је и до 10 пута већа концентрација пептида ( $\sim 1,2 \text{ mg/cm}^3$ ) која у случају АСЕ-инхибиторне активности није условила значајније веће вредности од остварених 62,31 и 51,95 % код изоловане фракције пептида и хидролизата, редом. Наведено је нарочито изражено у случају смеше пептида у узорку хидролизата, због чега се претпоставља да присуство пептида веће молекулске масе и дужих секвенци спречава АСЕ-инхибиторну активност пептида који управо поседују ову биолошку активност. Такође, пептиди који испољавају значајну АСЕ-инхибиторну активност у изолованој фракцији, са тачно дефинисаном структуром и дужином секвенце пептида молекулских маса 3-10 kDa, успостављањем корелације показују јачу позитивну корелацију са антиоксидативном активношћу у поређењу са хидролизатом.

Супротно овим резултатима, у студији антиоксидативне и антихипертензивне активности хидролизата протеина беланцета добијених у трочасовном једностепеном поступку са пепсином није пронађена корелација између антиоксидативних и АСЕ-инхибиторних активности, као хидролизата тако и фракције мање од 3 kDa. Међутим, изолован пептид секвенце Tyr-Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Phe-Leu који је испољио јако АСЕ-инхибиторно дејство са вредношћу инхибиторне концентрације ( $IC_{50}$ ) од 4,7  $\mu\text{M}$ , такође је показао високу активност неутрализације „хватања“ слободних радикала (вредност капацитета апсорпције

кисеоничног радикала износила је 3,8  $\mu\text{mol}$  Тролокс еквивалента по  $\mu\text{mol}$  пептида) и утицао је на одлагање липидне оксидације липопротеина ниске густине индуковане јонима  $\text{Cu}^{2+}$  при концентрацији од 0,16 mg/mg липопротеина ниске густине.<sup>60</sup> Исто тако, у студији у којој су протеини беланцета хидролизоване гастроинтестиналним ензимима (пепсин и панкреатин) или не-гастроинтестиналним ензимима (термолизин и алкалаза) корелација између антиоксидативне и антихипертензивне активности међу хидролизатима и изолованим фракцијама пептида није утврђена.<sup>394</sup> Међутим прегледом доступне литературе из области медицинских истраживања, врло је дискутабилна корелација између оксидативног стреса и антихипертензивне активности, али се генерално она не може искључити и истраживачи су *in vivo* испитивањима уочили значајну негативну корелацију између дијастолног крвног притиска и неколико ендогених антиоксидативних стања код пацијената са хипертензијом.<sup>395</sup>

Генерално, резултати добијени у току рада на овој докторској дисертацији дају допринос објашњењу механизма антиоксидативног и антихипертензивног деловања најактивније фракције пептида протеина беланцета, као и увид у корелацију између интензитета антиоксидативне активности (степен неутралисања  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  радикалног катјона) и антихипертензивне активности. Такође, могуће је изнети претпоставку да су антиоксидативна и антихипертензивна активност значајно повезане са аминокиселинским саставом, тј. садржајем хидрофобних и позитивних наелектрисаних аминокиселина, редом, али и да су у корелацији са пептидима молекулске масе 1-3 и 3-10 kDa. Стога, разумевање односа између наведених биолошких активности и физичко-хемијских особина хидролизата и/или фракција пептида је важно како би се олакшао развој технологије за припрему фракција пептида протеина беланцета са унапређеним наведеним биолошким активностима.

#### **7.7.2. Утицај састава и величине пептида на антикоагулативну активност изолованих фракција пептида**

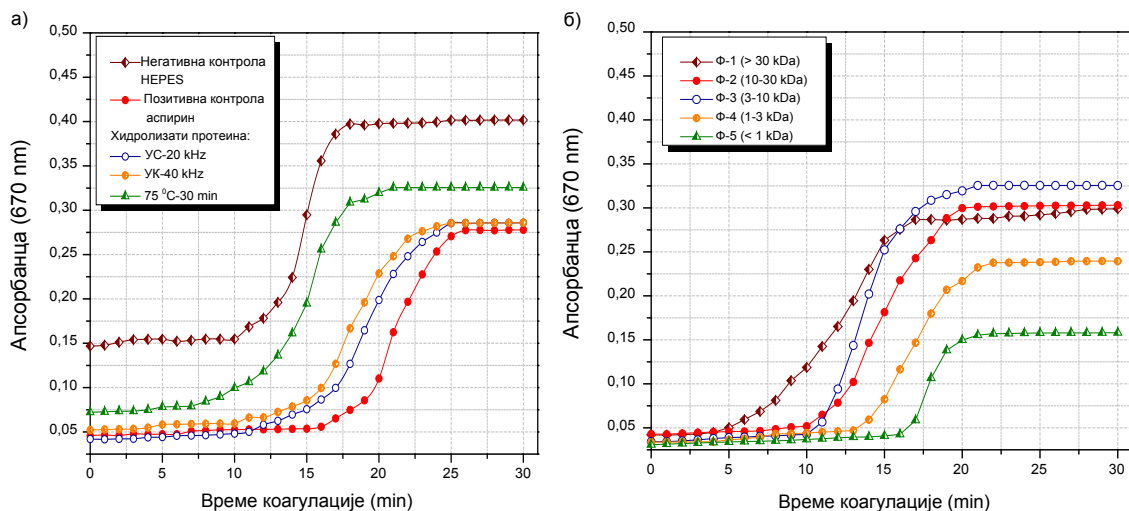
Пептиди са антитромбинском активношћу, изоловани из прехранбених протеина, који не испољавају никакве токсичне ефекте, имају широку примену у превенцији, па чак и лечењу кардиоваскуларних обољења.<sup>396</sup> Наиме, коагулација представља део физиолошког процеса који води формирању тромбина и



фибриноског угрушка (коагулума), и првобитно започиње бифуркационом каскадом коју чине два различита пута протеолитичких реакција, унутрашњи и спољашњи. Процеси унутрашњег и спољашњег пута воде активирању једног заједничког фактора, фактора X, који се обележава као X<sub>a</sub> (слово а означава активирани фактор). Познато је да се функција унутрашњег пута одређује мерењем активираниог парцијалног тромбoplastинског времена (*на енгл.* activated partial thromboplastin time, aPTT), док се функција спољашњег пута одређује мерењем протромбинског времена (*на енгл.* prothrombin time, PT).<sup>397</sup> Главни фактор згрушавања крви унутрашњим путем јесте калцијум. Прегледом доступне литературе, уочено је да је коришћењем рекалцификационе технике могуће одредити антикоагулативна својства различитих биоактивних једињења, за која је претходно утврђено да поседују неке од биолошких активности. Пептиди са антиромбинском активношћу, изоловани из прехранбених протеина, који при томе не испољавају никакве токсичне ефекте, имају широку примену у превенцији и лечењу кардиоваскуларних обољења.

Природни антикоагуланти који имају велики потенцијал у контроли коагулације крви преко унутрашњег и спољашњег пута, а могу бити компоненте функционалне хране јесу биолошки активна фенолна једињења и пептиди. У оквиру истраживања ове докторске дисертације, антикоагулативна активност хидролизата и/или изолованих фракција пептида протеина беланцета претретираних ултразвуком фреквенци  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz одређена је *in vitro* применом рекалцификационе технике при којој се свеже цитратној плазми додаје калцијум. Анализирани узорци пептида беланцета, како хидролизати, тако и фракције пептида, сведени на исте концентрације инкубирани су са рекалцификоаном плазмом, али је том приликом испитан утицај две различите концентрације пептида: 1 и 0,1 mg/cm<sup>3</sup>. Добијени резултати графички су приказани у облику рекалцификационих кривих на Слици 7.30. Аспирин, активни инхибитор коагулације крви тј., инхибитор тромбосана и простагландина, који при нормалним условима везују молекуле тромбоцита и формирају угрушак на отвореном или оштећеном крвном суду или поврећеном ткиву, у оквиру ове докторске дисертације коришћен је као позитивна контрола (комерцијални стандард) у концентрацији 0,4 mg/cm<sup>3</sup> за поређење антикоагулативне способности. Утицај ултразвучног претретмана, ензимске хидролизе, састава и величине пептида у овој фази истраживања испитан је и поређењем антикоагулативне активности са активношћу пептида ослобођених током

конвенционалног термичког третмана, како и са основним пуфером HEPES-ом, коришћеним током припреме разблажења (негативна контрола). Уопштено, антикоагулативна својства пептида беланцета, у оквиру ове дисертације, на унутрашњем путу коагулације описана су повећањем времена коагулације рекалцификоване крвне плазме.



**Слика 7.30.** Рекалцификационе криве хидролизата протеина беланцета претретираних различитим третманима (а) и фракција пептида изолованих из хидролизата протеина претретираних ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz (б). Концентрације узорка пептида су  $1 \text{ mg/cm}^3$ , концентрација позитивне контроле-аспирина је  $0,4 \text{ mg/cm}^3$ .

Графички приказани резултати на Слици 7.30а јасно показују да време коагулације рекалцификационе крвне плазме у присуству радног пуфера, у количини која одговара анализираним узорцима, по додатку калцијум-хлорида (на дијаграму обележено са *негативна контрола-HEPES*) износи 18 минута, односно коагулација почиње у току шестог минута и завршава се 18. минута. Додавањем узорка хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвуком високог интензитета и/или високом температуром, евидентно је благо позитивно померање времена коагулације рекалцификоване крвне плазме. У случају узорка хидролизата протеина беланцета претретираних термички и ултразвуком (фреквенце  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz) при анализираној концентрацији пептида  $0,1 \text{ mg/cm}^3$  коагулација се завршава током 13. и 15. минута, редом (*резултати нису приказани*), што се испоставило као значајно ниже време у поређењу са временом коагулације рекалцификоване плазме без антикоагуланата, тј. негативне контроле ( $p < 0,05$ ). Коагулација рекалцификоване плазме у присуству 10 пута веће концентрације пептида ( $1 \text{ mg/cm}^3$ ) у узорцима

хидролизата значајно је померена ( $p < 0,05$ ) и описана је продужењем времена коагулације на унутрашњем путу за 8 минута у присуству смеше пептида хидролизата у којима су протеини беланцета непосредно пре дејства алкалазе били изложени дејству ултразвучних таласа фреквенце  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz. Међу резултатима са Сlike 7.30a уочава се и рекалцификациона крива која представља коагулацију крвне плазме у присуству раствора аспирина концентрације  $0,4 \text{ mg/cm}^3$ , и могуће је запазити да се у овом случају коагулација завршава у исто време, 25. минут, као и са пептидима из хидролизата протеина претретираних ултразвучним таласа фреквенце  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz. Узорак пептида из хидролизата термички претретираних протеина у поређењу са негативном контролом није испољио значајну антикоагулативну активност, с обзиром да је коагулација започета и завршена у потпуно идентичном временском периоду (6 и 18 min, редом). Додавањем пептида из хидролизата протеина претретираних ултразвучним таласима фреквенце  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz и међусобним поређењем времена коагулације није уочена значајна статистичка разлика ( $p > 0,05$ ) укупне антикоагулативне активности, као и да у поређењу са аспирином пептиди при концентрацији  $1 \text{ mg/cm}^3$  остварују једнак учинак и допринос у продужењу времена коагулације рекалцификоване плазме.

Како би се додатно анализирали антикоагулативна својства пептида протеина беланцета, изоловане фракције пептида из хидролизата протеина претретираних ултразвучним таласима фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz инкубиране су при претходно усвојеној концентрацији за узорке хидролизата ( $1 \text{ mg/cm}^3$ ) са рекалцификованом плазмом, а по додатку калцијум-хлорида праћен је процес коагулације (Слика 7.30б). Том приликом испитан је и утицај величине пептида са аспекта молекулске масе на време коагулације и утврђено је да пептиди различите величине имају потпуно другачији утицај. Детаљније, фракције пептида молекулске масе  $> 3 \text{ kDa}$  међу које се убрајају три изоловане ултрафилтрационе фракције протеина беланцета, фракција-1, фракција-2 и фракција-3, по додавању калцијум-хлорида условиле су коагулацију рекалцификационе плазме након 17, 20 и 18 минута, редом. Интересантно је да додатком пептида молекулске масе  $> 30 \text{ kDa}$  (фракција-1) није дошло до померања времена коагулације у поређењу са временом коагулације плазме (негативна контрола), већ је време коагулације било скоро идентично; коагулација је почела јако брзо већ петог минута, а завршена је након 17 минута. Додавање пептида, тачније олиго- и полипептида фракције-2 (10-30 kDa) и фракције-3 (3-10 kDa), условило је

благо позитивно померање почетка коагулације рекалцификационе плазме, које је износило 10 минута, али је и даље било значајно мање ( $p < 0,05$ ) у поређењу са аспирином. Према дискутованим резултатима могуће је претпоставити да пептиди великих молекулских маса, пре свега у облику полипептида који садрже више од 20 аминокиселинских остатака, не утичу на спречавање процеса коагулације плазме, а самим тим и коагулације крви, тако да антикоагулативна својства пептида протеина беланцета треба тражити у пептидима знатно мањих молекулских маса. Наведена претпоставка у сагласности је са подацима најразличитијих студија на тему антикоагулативних својстава пептида у којима пептиди који садрже 3-6 аминокиселинска остатака испољавају изражену антикоагулативну способност. На Слици 7.30б наранџастом и зеленом бојом представљена је коагулација рекалцификационе плазме у присуству фракције-4 и фракције-5, концентрације  $1 \text{ mg/cm}^3$  редом, и евидентно је да се у овим случајевима коагулација завршава раније него што је то случај са аспирином концентрације  $0,4 \text{ mg/cm}^3$ . Конкретно, пептиди молекулске масе 1-3 kDa (фракција-4) и  $< 1 \text{ kDa}$  (фракција-5) су у односу на узорке хидролизата и негативну контролу довели до повећања времена почетка процеса коагулације која су износила 13 и 16 минута, редом. Међутим, у присуству пептида молекулске масе 1-3 kDa и  $< 1 \text{ kDa}$  процеси коагулације су релативно кратко трајали, свега 9 и 4 минута, редом, због чега се може рећи да ове две изоловане фракције пептида поседују одговарајући ниво антикоагулативне активности који је упоредив са аспирином. Уколико би се ове фракције користиле даље за развијање препарата на бази пептида са антикоагулативним својствима, неопходно је утврђен одговарајући ниво антикоагулативне активности потврдити спровођењем детаљнијих тестова, који у оквиру израде ове доксторске дисертације нису били предвиђени. Наиме, у наредним истраживањима неопходно би било спровести *in vitro* тестове у којима ће се рекалцификационој плазми додавати тромболасти у вишку и тако одредити протромбинско време пептида беланцета и/или фосфолипиди и површински активатори за одређивање активног парцијалног тромбопластног времена пептида беланцета, који воде стварању фибринског угрушка и активацији фактора унутрашњег пута коагулације, редом.

Узмајући у обзир све резултате са Слике 7.30 могуће је извести закључак да пептиди протеина беланцета поседују одређен ниво антикоагулативне активности при концентрацији  $1 \text{ mg/cm}^3$ , која је најизраженија у случају пептида молекулске

масе 1-3 kDa (фракција-4). Зато се може рећи да је антикоагулативна активност у корелацији са пептидима мале молекулске масе, мање од 3 kDa. Међутим, како је прегледом доступне литературе уочено да у случају јаких антикоагуланата процес коагулације не започиње ни након 30 минута од тренутка додавања калцијум-хлорида,<sup>220</sup> пептидима беланцета при анализираној концентрацији кроз мерење времена коагулације рекалцификационе крвне плазме могу се преписати слаба антикоагулативна својства.

Антикоагулативна својства пептида протеина беланцета описана су у свега неколико научних студија у којима су одређена применом различитих *in vitro* метода. Током оптимизације ензимског поступка хидролизе протеина беланцета истраживачи су утврдили да се највећа вредност антикоагулативне активности (68,92%), изражене као проценат инхибиције коагулације у односу на контролу, добија након два сата хидролизе алкалазом при следећим оптималним процесним условима: концентрација супстрата 1%, концентрација алкалазе 5%, температура реакције 50 °C и рН реакције 8.<sup>398</sup> Биолошки активни пептид секвенце Arg-Val-Pro-Ser-Leu (RVPSL) изолован из протеина беланцета, показао је, како изолован из протеина тако и синтетисан хемијским путем, високу антикоагулативну активност са способношћу комплетне инхибиције коагулације крви при концентрацији од 100 mM, при чему су истраживачи истакли да овај пептид учествује у блокирању коагулационе каскаде.<sup>353</sup> Олигопептиди изоловани из беланцета користећи неколико протеолитичких ензима индуковали су значајно продужење протромбинског времена у поређењу са контролним узорцима, при чему су истраживачи утврдили да су олигопептиди инхибирани конверзују фибриногена у фибрин у спољашњем путу коагулације.<sup>399-400</sup>

## **7.8. ПРЕЧИШЋАВАЊЕ ИЗОЛОВАНИХ ФРАКЦИЈА ПЕПТИДА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА**

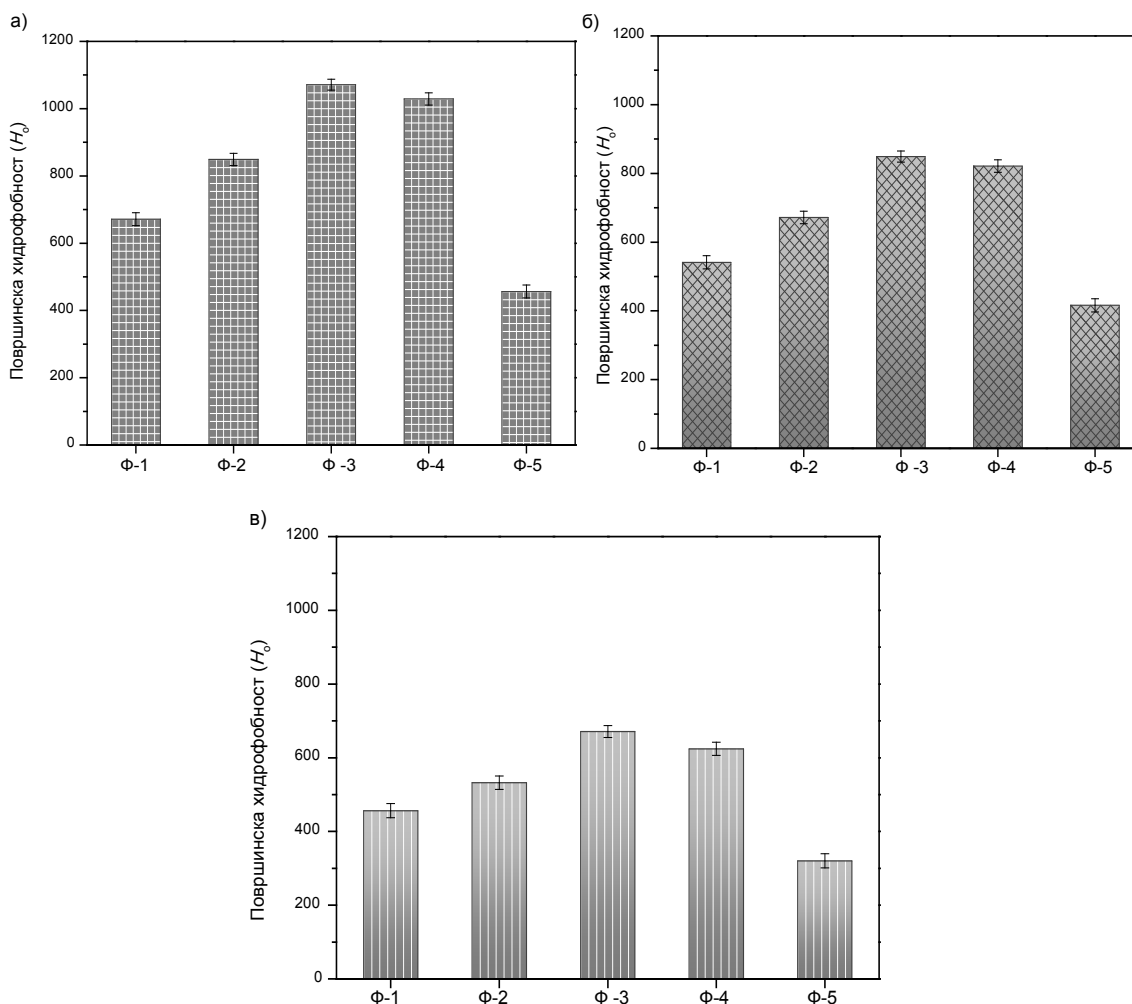
У прелиминарној фази истраживања која се односила на пречишћавање, припремљени хидролизати ултразвучно претретираних протеина беланцета и изоловане фракције пептида молекулске масе мање од 10 kDa анализирани су реверзно-фазном хроматографијом под високим притиском на Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific уређају у циљу утврђивања евентуалних губитака аминокиселина и мањих пептида током процеса дијализе. Процес дијализе, како је већ речено у одељку

6.3.9, извршен је након ензимске хидролизе протеина и декантовања супернатанта који је представљао жељени производ хидролизат протеина беланцета. Утврђено је да током корака дијализе не долази до губитака аминокиселина и мањих пептида одређивањем садржаја протеина методом по Лорију пре и после дијализе (*резултати нису приказани*). Додатно, применом течне хроматографије под високим притиском потврђено је да не долази до губитака аминокиселина и мањих пептида, на основу чињенице да се није појавио ни један пик на хроматограму раствора соли добијеном од дијализе. Ово је важно стога што би евентуални губитак аминокиселина и ди- и трипептида могао значајније да се одрази на нутритивну вредност крајњег производа хидролизата, а самим тим и на фракције пептида добијене ултрафилтрирањем кроз целулозне мембране применом ултрафилтрационе ћелије за филтрацију (одељак 6.3.12). Хроматограми хидролизата добијени хидролизом протеина беланцета претретираних ултразвучним таласима фреквенце  $40 \pm 2$  kHz и високом температуром, као и њихове фракције пептида молекулске масе мање од 10 kDa дати су на сликама приложеним у Прилогу 4.

Свеукупним анализирањем хроматограма приказаних на сликама у Прилогу 4 могуће је изнети запажање да анализирани узорци хидролизата претретираних ултразвучним таласима и високом температуром садрже велики број пептида чији састав чине поларни аминокиселински остаци, за које се може претпоставити да потичу од аминокиселина Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, His, Asn и Gln. Такође, код хидролизата претретираних ултразвучним таласима било је могуће уочити и пептиде умерене хидрофобности, што код хидролизата протеина претретираних термички није забележено при елуцији и градијентном режиму раздвајања кроз колону која је у обом истраживању примењена. Интересантно је да када су у питању анализирани фракције пептида из прелиминарних експеримената нису раздвојени пептиди са неполарним аминокиселинским остацима или су неполарни остаци у поређењу са поларним остацима заступљени у значајно мањој количини. Посматрањем ретенционих времена и броја раздвојених пикова пептида, тј. профила пептида, фракције пептида изоловане из хидролизата ултразвучно претретираних протеина имају већу хидрофобност, али и другачији профил изолованих пикова.

Сходно наведеном, у наредној фази одређена је укупна површинска хидрофобност хидролизата и изолованих фракција пептида (Слика 7.31), како би се створила јаснија слика о садржају пептида чији пептидини ланци садрже поларне

и/или хидрофобне аминокиселинске остатаке, а у складу са резултатима из потпоглавља 7.4, 7.5, 7.6 и 7.7 фракције пептида са најизраженијим биолошким активностима пречишћене су на нове фракције применом препаративне гел-филтрационе хроматографије (Слика 7.32, Прилог 6) и окарактерисане са аспекта антиоксидативне активности са циљем утврђивања могућности њихове употребе као пречишћених биолошки активних фракција пептида.



**Слика 7.31.** Површинска хидрофобност ултрафилтрационих фракција пептида протеина беланцета претретираних: а) ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz -15 минута, б) у ултразвучном купатилу фреквенце  $40 \pm 2$  kHz-15 минута и в) термички на  $75$  °C-30 min.

Површинска хидрофобност изолованих ултрафилтрационих фракција је упоређена и приказаним резултатима потврђено је да највећу хидрофобност поседују управо фракције пептида са најизраженијим биолошким активностима, фракција-3 (3-10 kDa) и фракција-4 (1-3 kDa). Како је промена површинске хидрофобности свих узорака ултрафилтрационих фракција праћена везивањем хидрофобне

флуоресцентне пробе 8-анилино-1-нафтагенсулфонске киселине за постојеће хидрофобне регионе на површини молекула путем неполарне анилин-нафтагенске групе, забележено је знатно повећање индекса флуоресценције за фракције пептида, молекулских маса 3-10 и 1-3 kDa, добијених ултрафилтрационим раздвајањем хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвучним таласима ( $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz). У поређењу са фракцијама пептида исте расподеле молекулских маса из хидролизата термички претретираних протеина резултати указују на чињеницу да су ултразвучни претретмани значајно утицали на конформациону покретљивост протеина и већу изложеност хидрофобних група и региона из унутрашњости молекула протеина. На тај начин субсеквентном селективном хидролизом ендонептидазом алкалазом укупна површинска хидрофобност хидролизата је промењена, а самим тим и хидрофобност развојених ултрафилтационих фракција. Алкалаза, ендонептидаза, поседује велику специфичност према пептидним везама формираних између глицина и хистидина, серина и хистидина, леуцина и тирозина и триптофана и тирозина,<sup>248</sup> па је садржај поларних аминокиселинских остатака претпостављен из хромограма хидролизата и/или фракција пептида оправдан. Претретманом протеина беланцета термички ( $75\text{ }^\circ\text{C}-30\text{ min}$ ) образују се протеински агрегати услед делимичне денатурације протеина, који су мање доступни ендонептидази алкалази, а за које се претпоставља да и након хидролизе задржавају одређен ниво агрегата. Тако, хидрофобне групе и региони молекула остају заштићени и индекс флуоресценције хидролизата, али и развојених фракција пептида је смањен. Конкретно, претпоставља се да је кавитациони ефекат настао деловањем ултразвучне сонде условио највеће смањење међумолекулских интеракција што је условило преуређење хидрофобних региона у унутрашњости молекула. У прилог наведеном говоре и остварени резултати површинске хидрофобности након ултразвучног и термичког претретмана протеина датих у Прилогу 5.

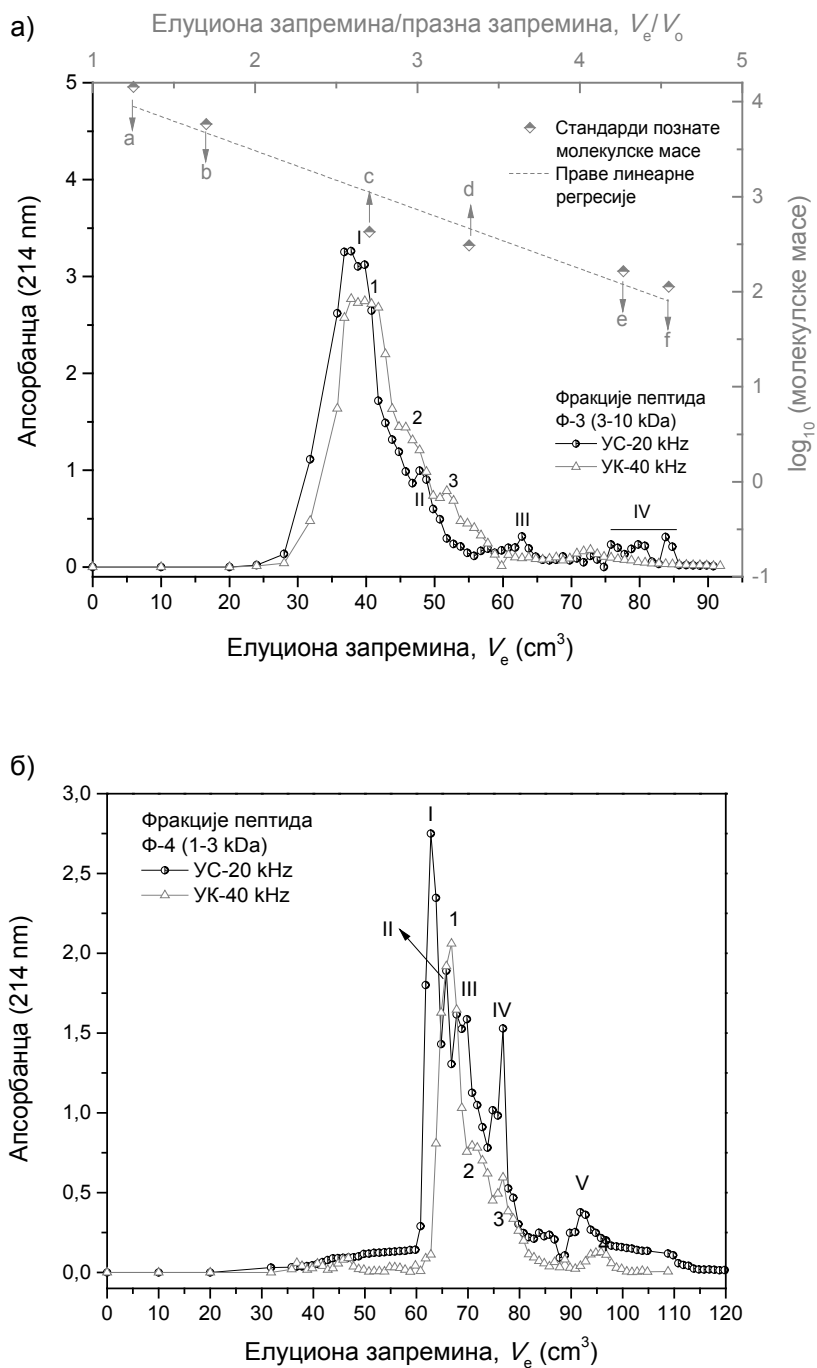
На основу емисионог спектра флуоресценције евидентно је да су ултразвучни претретмани фреквенце  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz утицали на знатно померање емисионог максимума,  $\lambda_{\text{max}}$  у опсегу таласних дужина 338-380 nm, које је у литератури познато као батохромни ефекат. Литературни подаци указују на чињеницу да спектар флуоресценције ултразвучно претретираних протеина беланцета потиче највише од аминокиселинских остатака триптофана, тирозина и фенилаланина, али да се јачина



интензитета флуоресценције ових аминокиселинских остатака смањује услед њихове веће изложености молекулима растварача.<sup>293</sup> Такође, приказни емисиони спектри са емисионим максимумом на 362 nm чини се да одговарају флуоресцентном спектру триптофана у јако хидрофобној средини, као и да узорци након деловања ултразвучних таласа имају флексибилнију конформацију у односу на нативно беланце и узорке изложене дејству топлоте на високој температури.<sup>401-402</sup>

Објашњен утицај претретмана ултразвучним таласима и термички на доступност хидрофобних група и региона, али и порекло самог емисионог спектра од аминокиселинских остатака триптофана, тирозина и фенилаланина, у сагласности је са свеукупно анализираним хроматограмима припремљених хидролизата претретираних протеина беланцета насталих раздвајањем узорака на реверзно-фазној колони у систему течне хроматографије под високим притиском. Посматрањем ултрафилтрационих фракција пептида и њихових вредности површинске хидрофобности могуће је претпоставити да је код фракција пептида молекулске масе веће од 30 kDa, због садржаја већег броја поларних аминокиселинских остатака и мање флексибилне конформације полипептидних ланаца присуство хидрофобних региона смањено, што није случај код три- и олигопептида који улазе у састав фракција 3-10 и 1-3 kDa. Фракције пептида молекулске масе мање од 1 kDa (дипептиди и слободне аминокиселине) у овом истраживању испољиле су најмање вредности свих испитаних биолошких активности и најмањи масени удео, а најнижом вредношћу површинске хидрофобности потврђено је да је контролисаном хидролизом до степена хидрлизе од 28% остварен најмањи принос дипептида и слободних аминокиселина.

Овим резултатима додатно је потврђена и успостављена релација између ултрафилтрационих фракција пептида тачно дефинисаних молекулских маса и њихове површинске хидрофобности са биолошким активностима.



**Слика 7.32.** Хроматограми фракција пептида молекулске масе 3-10 kDa (а) и 1-3 kDa (б), изолованих из хидролизата протеина претретираних ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz и у ултразвучном купатилу фреквенце  $40 \pm 2$  kHz и развојених на гел-филтрационој колони са Toyoperal HW-40F пуњењем. Стандардна права контруисана је на основу елуционих запремина стандарда познатих молекулских маса: а–лизозим (14300 Da), б–инсулин (5800 Da), в–хипурил-L-хидтидин-L-леуцин (429,47 Da), г–редуковани L-глутатион (307,32 Da), д–фениланин (165,19 Da) и ђ–L-леуцин (113,17 Da).

Са приказаних хроматограма препаративне гел-филтрационе хроматографије очигледна је веома мала разлика у расподели величине пептида и њихових секвенци фракција добијених раздвајањем ултрафилтрационих фракција молекулске масе 3-10 kDa изолованих из хидролизата протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz и у ултразвучном купатилу фреквенце  $40 \pm 2$  kHz (Слика 7.32a). На основу расподеле величине пептида евидентно је да су из фракције пептида протеина подврнутих ефекту кавитације изоловани мањи три- и дипептиди молекулске масе  $< 3$  kDa. Реч је о јасно видљивим пиковима пептида чија молекулска маса на основу конструисане стандардне праве одговара молекулским масама 3,429 и 3,165 kDa, фракције III и IV са Сlike 7.32a. На овај начин, још једном, потврђена је јасна разлика међу анализираним ултразвучним претретманима, а значајнији утицај деловања ултразвучне сонде на структуру нативних протеина беланцета, њихову изложеност протеолитичком ензиму алкалази је незанемарљив. Хроматограми са Сlike 7.32b такође указују на значајну разлику у расподели величине пептида и њихових секвенци код узорка третитаних ултразвуком фреквенце  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz, при чему су се посебно издвојиле фракције IV и V. Ове фракције изоловане су из узорка фракције протеина претретираних ултразвучном сондом, док код узорка фракције претретираних у ултразвучном купатилу, ове најмање фракције нису уочене. Реч је о фракцијама чије масе на основу стандардне праве одговарају масама 1,286 и 1,221 kDa за фракције IV и V, редом. У поређењу са хроматограмом фракције пептида (3-10 kDa) из хидролизата термички претретираних протеина које су испољиле ниже анитоксидативне активности, а из које су изоловане свега три фракције (Прилог 6), ултразвучни претретман се показао као значајно адекватнији са спекта расподеле величине и профилисања пептида носиоца антиоксидативне активности. UV-детекцијом на таласној дужини 280 nm која је карактеристична за фенолно језгро, тј. аминокиселинске остатке фенилаланина, триптофана и тирозина (*хроматограми нису приказани*), пептиди изоловани из фракција пептида 3-10 kDa хидролизата термички и ултразвучно претираних протеина, значајна вредност уочена је једино у случају пептида из узорка који је био претретман ултразвучном сондом, фракција IV. Када су у питању пептиди изоловани из фракција пептида 1-3 kDa хидролизата термички и ултразвучно претираних протеина, три фракције су имале висок интензитет на 280

nm: фракције пептида IV и V из узорка који је био претретиран ултразвучном сондом и једна фракција из узорка који је био претретуран високом температуром.

Све изоловане фракције пептида анализирани су са аспекта антиоксидативне активности одређивањем способности неутралисања ABTS<sup>•+</sup> радикалног катјона, и добијени резултати приказани су у Табелама 7.9 и 7.10.

**Табела 7.9.** Антиоксидативна активност фракција пептида изолованих раздвајањем ултрафилтрационих фракција молекулских маса 3-10 kDa применом препаративне гел-филтрационе хроматографије.

УС-20 kHz (3-10 kDa)					УК-40 kHz (3-10 kDa)		
Хроматографске фракције	I	II	III	IV	1	2	3
Степен неутралисања ABTS <sup>•+</sup> (%)	79,71 ±0,98	75,38 ±0,98	26,34 ±0,98	27,61 ±0,98	70,04 ±0,98	71,03 ±0,98	72,13 ±0,98

**Табела 7.10.** Антиоксидативна активност фракција пептида изолованих раздвајањем ултрафилтрационих фракција молекулских маса 1-3 kDa применом препаративне гел-филтрационе хроматографије.

УС-20 kHz (1-3 kDa)					
Хроматографске фракције	I	II	III	IV	V
Степен неутралисања ABTS <sup>•+</sup> (%)	82,83 ±0,98	83,63 ±1,11	82,63 ±1,04	82,80 ±1,01	84,10 ±1,08
УК-40 kHz (1-3 kDa)					
Хроматографске фракције	1	2	3	4	
Степен неутралисања ABTS <sup>•+</sup> (%)	65,17 ±1,02	65,31 ±1,12	61,09 ±1,05	26,06±1,17	

Анализирањем резултата антиоксидативне активности приказаних у Табелама 7.9 и 7.10 утврђена је способност неутралисања ABTS<sup>•+</sup> радикалног катјона у изолованим фракцијама пептида, које се међусобно значајно разликују и на основу којих је одређено које су фракције носиоци испитане биолошке активности. Конкретно, међу изолованим фракцијама пептида I, II, III и IV из узорка третираног ултразвучном сондом (3-10 kDa), пептиди фракције I и II окарактерисани као

олигопептиди испољили су чак три пута већу способност неутрализације радикалског катјона у поређењу са фракцијама III и IV чије су вредности степена неутрализације износиле  $\sim 27\%$ . У случају фракција пептида 1, 2 и 3 изолованих из узорка третираног у ултразвучном купатилу није забележено статистички значајно смањење ( $p > 0,05$ ) антиоксидативне активности са смањењем величине пептида у фракцијама, а степен неутрализације био је занемарљиво нижи од степена неутрализације фракција пептида I и II ( $\sim 72\%$ ). Резултати јасно показују да пептиди мањих молекулских маса, изоловани при већим елуционим запреминама и дужим ретенционим временима, истовремено са смањењем молекулске масе испољавају мању антиоксидативну активност у случају фракција пептида за узорак третиран ултразвучном сондом. Способност неутралисања  $ABTS^{+}$  радикалског катјона у фракцијама пептида I, II, III, IV и V изолованих из узорка ултрафилтрационе фракције 1-3 kDa изоловане из хидролизата протеина третираних ултразвучном сондом (Табела 7.10) била је значајно већа у поређењу са осталим фракцијама, а интересантно је запажање да са смањењем молекулске масе пептида антиоксидативна активност није се значајно мењала и износила је  $\sim 82\%$ . На основу оваквог резултата може се претпоставити да су пречишћени и изоловани пептиди молекулске масе  $< 3$  kDa носиоци антиоксидативне активности и да, иако је ултрафилтрациона фракција са овим пептидима испољила нешто слабије антиоксидативне способности (поглавље 7.4), ови пептиди поседују активност која се не може занемарити. Међутим, у случају узорка третираног у ултразвучном купатилу изоловани пептиди у фракцијама 1, 2, 3 и 4 испољавају значајно нижу антиоксидативну активност, а са смањењем молекулске масе пептида, уочљив је драстичан пад антирадикалског деловања.

Свеобухватно, на основу добијених резултата у овој фази истраживања утврђена је различита расподела величине пептида међу узорцима третираним ултразвучном сондом и у ултразвучном купатилу. Разлике се пре свега односе на број изолованих фракција, али и на молекулске масе пептида, при чему са аспекта антиоксидативне активности пептиди изоловани из нативних протеина прететираних ултразвучном сондом испољавају јаче антирадикалско деловање. Овакав резултат у потпуности је у сагласности са свим претходним резултатима испитивања и карактеризације фракција пептида молекулске масе 3-10 и 1-3 kDa. Такође, потребно је исаћи да су изоловане фракције пептида са највишим

вредностим антиоксидативних активности допринеле укупној високој антиоксидативној активности фракција пептида молекулске масе 3-10 и 1-3 kDa из хидролизата припремљених након ултразвучног претретмана. У поређењу са литературним подацима који се односе на пептиде изоловане из протеина који се користе у прехранбеној индустрији, а према којима пептиди са високом антиоксидативном активношћу имају молекулску масу у распону од 0,5 до 1,8 kDa,<sup>125, 403</sup> приказани резултати једним делом нису у сагласности. Наиме, као пептиди са високом способношћу антирадикалске активности изоловани из хидролизата протеина беланцета изоловани су и они чија је молекулска маса већа од 3 kDa. Претпоставља се да је овакав резултат последица непотпуне ензимске хидролизе, тј. ензимске хидролизе која водећи се биолошком активношћу током хидролизе није вођена до краје већ само до степена хидролизе ~ 28%. Због тога, коришћена ендопептидаза алкалаза није хидролизовала настале олигопептиде на мање ди- и трипептиде, као и слободне аминокиселине. На овај начин, биолошка вредност олигопептида је сачувана, они су изоловани и као такви могу се без допунских, енергетско и економски приметних фаза раздвајања користити као додаци нутрацеутицима и/или као суплементи функционалној храни.

## **7.9. ПРОИЗВОДЊА БИОАКТИВНИХ ПЕПТИДА У МЕМБРАНСКОМ РЕАКТОРУ СА РЕЦИРКУЛАЦИЈОМ И ЊИХОВА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА**

У даљем раду у оквиру ове дисертације испитана је ензимска хидролиза протеина беланцета у систему континуалног реактора са мешањем и мембранским модулом уз рециркулацију под различитим условима. Како су у оквиру дискутованих резултата из потпоглавља 7.4, 7.5, 7.6 и 7.8 фракције пептида молекулске масе 3-10 и 1-3 kDa биле најактивније са аспекта анализираних биолошких својстава, вођени овим резултатима изабран је мембрански модул *cut-off* 10 kDa, састављен од полиетиленсулфонске мембране активне површине 50 cm<sup>2</sup>. У овако оформљеном континуланом систему хидролизат, који излази из ензимског реактора у коме се континуално доводи нова количина свежег супстрата нетретираних нативних протеина беланцета, пролази кроз мембрански модул (мембранску сепарациону јединицу) и фракционише се на основу молекулске масе на две фракције. При томе се фракција велике молекулске масе и ензими рециклирају у реактор, док се

производи мале молекулске масе одводе у резервоар. На тај начин ензим се рециклира, равнотежа реакције се помера у правцу хидролизе супстрата, што утиче на повећање степена хидролизе и уједно се постиже сепарација производа од ензима. Дакле у истом реакторском систем остварује се реакција и сепарација производа од недовољно прореаговалог супстрата и ензима. Ово је од великог значаја јер се ензим рециклира чиме се смањују производни трошкови, а настали производи нису контаминирани ензимом, па су уједно и смањени трошкови пречишћавања производа. На овај начин, избором наведеног одговарајућег мембранског модула, могу се добити хомогене фракције пептида, финални производи, јасно дефинисаних физичко-хемијских својстава, биолошких активности и устаљеног квалитета.<sup>186, 404</sup>

У прелиминарним истраживањима, која су се односила на развој и оптимизацију ензимског поступка хидролизе протеина беланцета у проточном реактору са мешањем повезаним са мембранском модулом, од стране истраживача Јаковетић и сарадника<sup>189, 405</sup> приступило се најпре испитивању утицаја оперативних параметара и режима мешања на ток и брзину хидролизе и то утицај геометрије и брзине обртаја мешалице, а затим и утицај протока пермеата. Пре почетка хидролизе извршен је термички претретман протеина беланцета на 75 °C у току 30 минута, како би се извршила делимична денатурација протеина и тиме повећала њихова доступност дејству ендо-пептидазе. Непосредно пре термостатирања, третиран узорак протеина је филтриран, а пре додатка ендо-пептидазе температура и рН ове реакционе смеше подешене су на оптималне за дејство алкалазе (Табела 6.1). Сваких 15 минута мерена је запремина истеклог пермеата кроз мембрански модул и одвајана у песебан суд, и истовремено је додавана иста запремина свеже припремљеног супстрата (тзв. *доливни поступак*), док је рН реакционе смеше одржаван константним додавањем адекватне количине базе. Оптимизацијом и развојем овог доливног поступка закључено је да врста и геометрија мешалице значајно утиче на брзину реакције хидролизе термички претретираних протеина и да су најбољи резултати добијени применом пропелерске мешалице са четири пропелера која је и изабрана за даља испитивања у доливном и континуалном систему. Проток пермеата, као један од важних хидродинамичких параметара, вариран је и у интервалу 1,6-2,5 cm<sup>3</sup>/min и остварени су идентични равнотежни степени хидролизе. Проток пермеата 2,1 cm<sup>3</sup>/min коришћен је при развоју континуалног система пошто је са становишта практичности боље радити при већим протоцима при којима се остварује исти

равнотежни степен хидролизе као при мањим, али се добија већа количина производа у виду фракција пептида, односно постижу се већи капацитети производње.

Резултати су указали и на то геометрија мешалице значајно утиче на брзину и принос ензимског процеса, при чему дифузионе лимитације нису једини разлог овог утицаја, већ да је алкалаза веома осетљива на денатурацију услед сила смицања које неки од облика мешалица проузрокују. Како је основни циљ прелиминарне фазе истраживања био дизајн биореактора и избор одговарајуће конфигурације, упоређене су брзине реакција и ефикасности процеса у претходно описаном и оптимизованом шаржном реакторском систему (потпоглавље 7.1) и проточном реактору са мешањем повезаним са мембранском сепарационом јединицом при приближно истим хидродинамичким и реакционим условима, а користећи ендонуклеазу алкалазу. Овим поређењем у мембранском систему постигнута је значајно већа брзина реакције, односно већи просторно-временски принос реактора него у шаржном реактору са мешањем. Додатним испитивањем стабилности утврђено је да се у мембранском реакторском систему може континуално производити стабилан хидролизат током 16 h.<sup>189, 405</sup>

Због присуства инхибитора специфичне серинске протеазе алкалазе у нативном беланцету и мале овомукоидне осетљивости на ензимску хидролизу, током читавог истраживања у оквиру ове докторске дисертације хидролиза протеина беланцета вођена је тако да се пре додавања протеолитичког ензима нативни протеини беланцета третирају или термички или ултразвуком високог интензитета. Циљ је био пронаћи услове који ће довести до неповратне денатурације инхибитора алкалазе, а истовремено неће резултирати формирањем нерастворљивих агрегата и/или преципитата који су лоши супстрати за ензимску хидролизу, као и унапређења биолошких својстава насталих хидролизата али уз очување нутритивних својстава. Наведно је ефикасно остварено применом ултразвука високог интензитета у ултразвучном купатилу фреквенце  $40 \pm 2$  kHz или употребом ултразвучне сонде фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz. Зато је у доливном поступку изведена хидролиза ултразвучно претретираних протеина и упоређена са претходно описаним резултатима (Слика 7.33). Током извођења претходно описаног доливног поступка ултразвучно и термички претретираних протеина беланцета у проточном реактору са мембранском сепарационом јединицом, уочено је да долази до знатног концентровања супстрата у



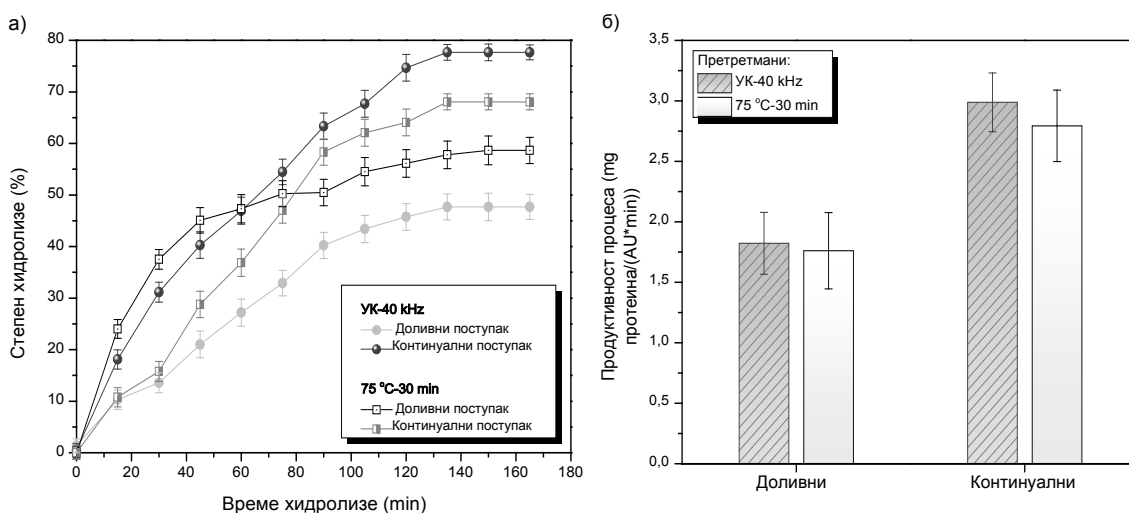
реакторском суду са мешањем, које је проузроковало инхибицију ензима супстратом у вишку.

За индустријску примену током процесирања хране и/или прехранбених протеина у поређењу са лабораторијским уређајима који се користе за ултразвучни третман потребни су робуснији емитери ултразвучних таласа који се не могу пригушити након много сати употребе. У ту сврху најчешће се конструишу ултразвучни реактори, тзв. соникатори који заузимају све већу примену.<sup>406</sup> С обзиром да су у узорцима хидролизата и фракција пептида, који су били изложени деловању ултразвучних таласа ( $40 \pm 2$  kHz) генерисаним у ултразвучном воденом купатилу, нешто ниже вредности биолошких активности у поређењу са ултразвучном сондом, следствено је било наставити континуалну производњу са ултразвучном сондом. Међутим, услед значајно веће запремине и потребе за временски дужим периодом рада, у овој фази истраживања протеини беланцета претретирани у ултразвучном купатилу ( $40 \pm 2$  kHz – 15 min) подвргнути су континуалном поступку хидролизе. Кју (Qu) и коаутори наглашавају да је приликом рада са великим запреминама расподела ултразвучне енергије кроз третиран раствор униформнија, за разлику од деловања ултразвучне сонде која уроњена у великој запремини концентрише енергију на једном месту.<sup>134</sup> У наставку истраживања ове докторске дисертације посебна пажња ће се посветити увећању система током третирања узорка ултразвучном сондом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz, као нпр. применом ултразвучног система са сонотродом, проточном ћелијом којом ће се вршити константна рецикулација третираног узорка.

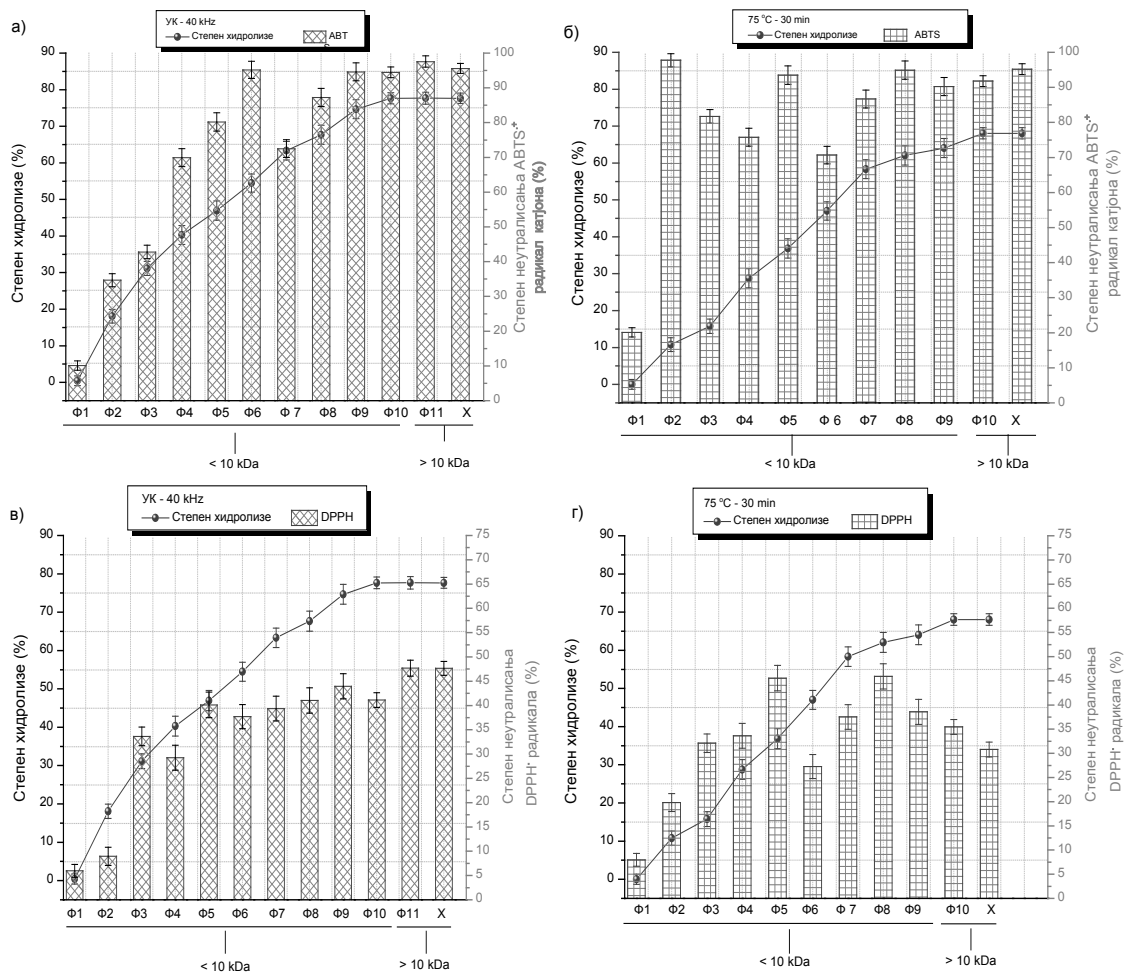
Увођењем континуалног поступка у коме је ултразвучно или термички претретирани свеж супстрат протеина беланцета све време довођен у реакциони суд са мешањем протоком којим је истицао пермеат ( $2,1 \text{ cm}^3/\text{min}$ ), није забележено концентровање супстрата, а остварени су значајно већи просторно-временски приноси реактора. Такође, смањена је и инхибиција алкалазе супстратом у вишку услед континуалног довођења ултразвучно претретираних протеина знатно веће конформационе покретљивости и доступности ензиму. Очигледно је било и смањење инхибиције ензима производом реакције јер су се пептиди мањи од 10 kDa уклањали из система и сакупљали као пермеати, чиме је спречено нагомилавање производа у ензимском реактору. Оваквим приступом и избором жељене величине ултрафилтрационе полиетиленсулфонске мембране (10 kDa) остворена је могућност

добиања производа чији састав чине ди-, три- и олигопептиди тачно одређених биоактивних својстава.

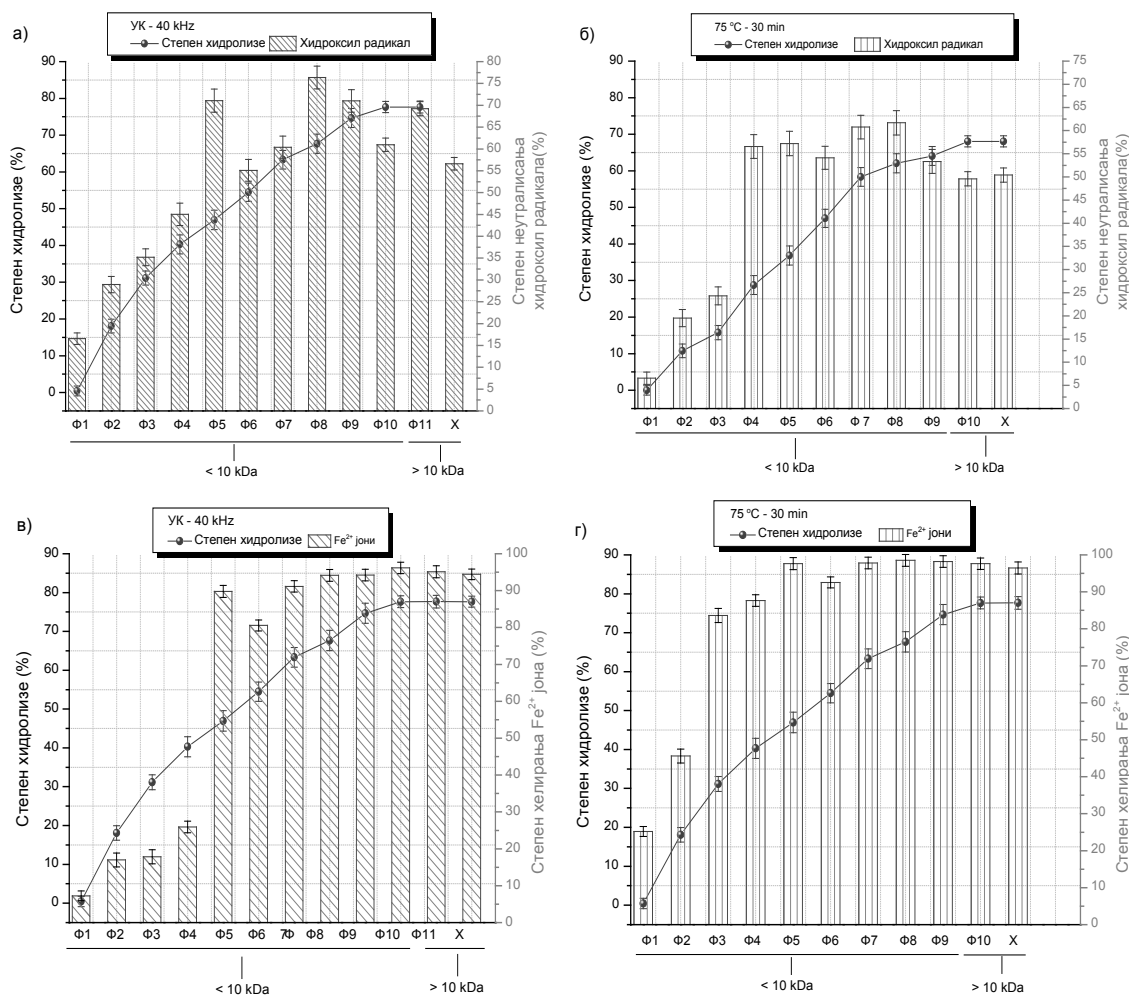
У даљем раду анализирана су биолошка својства добијених пермеата, тј. одвојених мембранских фракција и то антирадикалске способности кроз механизам „хватања“ слободних радикала за који су типичне реакције са DPPH• радикалом и ABTS<sup>•+</sup> радикал катјоном (Слика 7.34), механизам реаговања са слободним кисеоничним врстама (хидроксил радикал, •ОН) и кроз механизам хелирања Fe<sup>2+</sup> јона (Слика 7.34). Добијени резултати графички су приказани на Сликама 7.34 и 7.35.



**Слика 7.33.** Утицај начина извођења ензимског поступка хидролизе ултразвучно и/или термички претретираних протеина беланцета на степен хидролизе и продуктивност процеса: а) степен хидролизе у функцији времена при различитим рН вредностима, б) продуктивност процеса.



**Слика 7.34.** Степен неутралисања ABTS<sup>•+</sup> радикал катјона (а, б) и DPPH<sup>•</sup> радикала (в, г) биолошки активних фракција пептида добијених ензимским поступком хидролизе ултразвучно и/или термички претретаних протеина беланцета у континуалном реактору са мембранском сепарационом јединицом. *Легенда:* УК-40 kHz – ултразвучно купатило фреквенце 40±2 kHz-15 min; 75 °C-30 минута – висока температура.



**Слика 7.35.** Степен неутралисања •ОН радикала (а, б) и хелирања Fe<sup>2+</sup> јона (в, г) биолошки активних фракција пептида добијених ензимским поступком хидролизе ултразвучно и/или термички претретаних протеина беланцета у континуалном реактору са мембранском сепарационом јединицом. *Легенда:* УК-40 kHz – ултразвучно купатило фреквенце 40±2 kHz-15 min; 75 °C-30 минута – висока температура.

Превасходно, ефикасност ензимског поступка хидролизе претретаних протеина беланцета у континуалном систему са мембранском сепарационом јединицом, процењена у погледу остварених равнотежних степена хидролизе и продуктивности процеса, значајно је већа у поређењу са доливним поступком (Слика 7.33). У континуалном реакторском систему у зависности од реакционог времена и примењеног претретмана протеина беланцета остварени су равнотежни степен хидролизе до чак ~ 78%. Током извођења хидролизе термички претретаних протеина беланцета при секвенционалном доливању супстрата у поређењу са хидролизом ултразвучно претретаних протеина остварен је значајно ( $p < 0,05$ ) већи

равнотежни степен хидролизе,  $58,6 \pm 2,54$  и  $47,7 \pm 2,43$  %, редом. Са овог становишта, извођење хидролизе соницираних протеина при константном доливању свежег претретираног супстрата показало се као знатно ефикасније и подобније за унапређење поступка, јер је хидролиза унапређења 1,6 пута. Остварени равнотежни степени хидролизе у овом случају били су  $68,1 \pm 2,54$  и  $77,7 \pm 1,44$  %, редом за термички претретман и соницирањем. Приказани резултати у складу су са литературним подацима у којима је ензимска хидролиза протеина биљног и животињског порекла значајно унапређена применом мембранских сепарационих система различитих конфигурација, као што су: протеини обезмашћених пшеничних клица,<sup>217</sup> сојин протеински изолат,<sup>186</sup> хемоглобин,<sup>407</sup> протеини сурутке,<sup>190, 408-410</sup> беланцета,<sup>188</sup> казеина,<sup>185</sup> и др. У погледу продуктивности, оба континуална система показала су високу продуктивност са аспекта производње пептида молекулске масе мање од 10 kDa у поређењу са доливним поступком, али међу њима није уочена статистички значајна разлика ( $p > 0,05$ ).

Интересантно је истаћи да су у поређењу са ензимским поступком у шаржном реакторском систему за протеине беланцета претретиране ултразвуком и високом температуром, реакције хидролизе вођење рН-стат методом (одржавањем рН 8,0) са аспекта степена хидролизе, постизале стационарно стање у мембранском реактору за свега 45 и 60 минута дужим реакционим временом, редом. Овакав резултат вероватно је последица засићења ензима супстратом и неопходно је у даљим истраживањима заменити праћење тока хидролизе неком од спектрофотометријских метода, али и оптимизовати количину ензима како би се реакционо време повећало, тј. како би у што дужем временском периоду могла да се одвија производња пептида протеина беланцета молекулских мањих од 10 kDa. Поступком описаним у континуалном систему припремљено је више од  $400 \text{ cm}^3$  фракције пептида молекулске мање од 10 kDa са свега 2,12 AU јединица алкалазе у реакционом систему. Поред тога, у шаржном реакторском систему долази до релативно наглог повећања степена хидролизе током првих  $\sim 50$  минута реакције ( $\sim 20\%$ ) са највећим брзинама реакције, након чега се равнотежа помера у десно са успостављањем стационарног стања 90-ог минута. У случају континуалног поступка, брзина реакција се временом не мења драстично, реакција је брза и учинковита, степен хидролизе се константно повећава, док је смањење брзине реакције забележено тек након два сата, при чему је убрзо после тога постигнуто стационарно стање. У студији Чјанга (Chiang) и сарадника,

протеини беланцета хидролизован су у мембранском реактору користећи модуле различитих опсега раздвајања при чему је испитан утицај различитих врста ензима, а том приликом за разлику од резултата са Сликe 7.33 ( $77,7 \pm 1,44$  %), истраживачи су након 8 сати континуалне хидролизе беланцета алкалазом забележили степен хидролизе од свега 10%, што је приближно осам пута мање. Највећи равнотежни степени хидролизе остварени су термолизином (60%), али је стационарно стање постигнуто већ након првог сата, док је са химотрипсином реакција брза, учинковитија и после 8 сати није успостављено стационарно стање.<sup>188</sup> Разлика у резултатима може се објаснити применом претретмана протеина беланцета и другачије постављеним оперативним условима рада.

Уопштено, из наведених резултата, остварују се јако високи жељени степени хидролизе применом ултразвучног претретмана и континуалног поступка хидролизе протеина беланцета, који могу бити полазна основа за адекватну замену конвенционалног термичког процесирања протеина беланцета заступљеном у прехранбеној индустрији, што је и био циљ.

Након потврде о високо постигнутим степенима хидролизе, била је неопходна даља карактеризација добијених фракција пептида са аспекта антиоксидативне активности. Претходно добијени резултати испитивања утицаја различите врсте претретмана на могућност хидролизе протеина беланцета у циљу побољшања основних биолошких својстава показали су значајно унапређење истих, па су тако даља испитивања вршена са циљем потврде биолошке вредности фракција пептида. Анализиране су све фракције пептида молекулске масе мање од 10 kDa сакупљене током хидролизе на сваких 15 минута и то: Ф1-Ф10 и Ф1-Ф9, за узорке ултразвучно и термички претретираног супстрата, редом (Сликe 7.34 и 7.35). Анализе су спроведене и на узорку из реакционог суда у коме се налазе непрореаговали супстрат, ензим и ретентат, односно пептиди молекулске масе веће од 10 kDa (*на сликама обележено са X*). Ензим у реакционом суду је инактивиран, и заједно са непрореаговалим супстратом одвојен центрифугирањем, па је у заосталом декантованом супернатанту, фракцији пептида молекулске масе веће од 10 kDa (*на сликама обележено са Ф-11 и Ф-10 за узорке ултразвучно и термички претретираног супстрата, редом*) одређена антиоксидативна активност.

Резултати испитивања антиоксидативне активности фракција пептида добијених у континуалном мембранском процесу са аспекта способности

неутралисања ABTS<sup>+</sup> радикаског катјона (Слика 7.34 а, б) указују на то да и у овом случају примењени претретмани протеина беланцета засигурно доводе до различите расподеле молекулских маса пептида у току трајања процеса хидролизе, што последично утиче на антиоксидативну активност фракција. Евидентан је направилан тренд раста или опадања степена неутралисања ABTS<sup>+</sup> радикал катјона са смањењем величине пептида, тј. са повећањем реакционог времена, док је сигурно да неке фракције пептида беланцета са ултразвучним претретманом имају значајно ( $p < 0,05$ ) веће вредности степена неутралисања ABTS<sup>+</sup> радикал катјона у поређењу са фракцијама пептида беланцета претретираних високом температуром. Веће вредности остварених степена инхибиције за ултразвучни претретман могу се објаснити управо различитим механизмом и типом делимичне денатурације протеина беланцета применом ултразвучних таласа у поређењу са денатурацијом проузрокованом високом температуром. У оба случају, током првих 60 минута уочљив је устаљен раст антирадикалске способности након чега се јаља варирање у вредностима. Тако, највећа антиоксидативна активност неутралисања ABTS<sup>+</sup> радикал катјона утврђена је у фракцијама пептида соницираних протеина беланцета добијених након 75 и 105 минута континуалне ензимске хидролизе, док су се у случају термички претретираних протеина беланцета најактивније фракције пептида добиле након 45 минута. Реч је о **фракцијама пептида Ф6 и Ф9** соницираних протеина беланцета са вредностима инхибиције радикала  $95,18 \pm 2,47$  и  $94,62 \pm 2,58\%$ , редом, док су **Ф2 и Ф5** најактивније фракције пептида термички претретираних протеина беланцета са вредностима  $97,73 \pm 1,86$  и  $93,48 \pm 2,63\%$ , редом. Континуални поступци у реактору са мембранском сепарационом јединицом и рецикулацијом, када је реч о примењеним претретманима, показали су се као изузетно ефикасни, имајући у виду да је вредност степена неутралисања ABTS<sup>+</sup> радикал катјона нативног, нехидролизованог и нетретираниог беланцета свега  $7,69 \pm 0,69\%$ , али и да су остварени степени инхибиције у фракцијама пептида  $< 10$  kDa и фракцији пептида  $> 10$  kDa већи у поређењу са вредностима хидролизата добијених ензимским поступком у шаржном реакторском систему (потпоглавље 7.4).

Испитивањем антирадикалске способности припремљених фракција пептида кроз механизам неутралисања DPPH<sup>•</sup> радикала (Слика 7.34 в,г) уочено је да током првих сат времена континуалне хидролизе ултразвучно и термички претретираних протеина беланцета, фракције пептида испољавају приближно идентичан ниво

супресије DPPH<sup>•</sup> радикала, иако су постигнути различити равнотежни степени, односно иако је расподела молекулских маса била различита (~ 40%). Овиме је потврђено да висок степен хидролизе не мора да значи да је остварена висока антиоксидативна активност, што се може преписати томе да настали пептиди нису носиоци својства неутралисања DPPH<sup>•</sup> радикала. Када је у питању механизам реаговања пептида протеина беланцета, идентичан резултат је остварен и извођењем хидролизе у шаржном реакторском систему, тако да је резултат ове фазе истраживања још једна потврда да, када је реч о пептидим беланцета, ова метода није најрелевантнија и да се антиоксидативно својство мора анализирати применом више поступака различитих по механизму деловања. Међутим, треба истаћи да даљим током хидролизе степен неутралисања DPPH<sup>•</sup> радикала благо расте и да се вредности крајњих фракција пептида **Ф8** и **Ф9** крећу око 45%, за протеине претретирани термички и ултразвучним таласима, редом. Свеукупно, приказане вредности степена неутралисања DPPH<sup>•</sup> радикала се не разлику значајно ( $p > 0,05$ ) у зависности од примењеног претретмана, али је у континуалном поступку хидролизе соницираних протеина изоловано седам фракција пептида са идентичним вредностима супресије DPPH<sup>•</sup> радикала, док је хидролизом термички претретираних протеина добијено свега четири фракције пептида са вредностима супресије DPPH<sup>•</sup> радикала већих од 33%. Веће вредности степена неутралисања ABTS<sup>•+</sup> радикалског катјона у односу на DPPH<sup>•</sup> радикал могу се приписати пре свега различитој растворљивости испитиваних слободних радикала, јер је познато да је ABTS<sup>•+</sup> радикалски катјон растворљив у води, док је слободан DPPH<sup>•</sup> радикал растворљив у метанолу. Надовезујући се на наведено треба истаћи и дифузионе лимитације током растварања фракција пептида у различитим растварачима у циљу анализирања способности „хватања“ слободних радикала. Континуални поступци у реактору са мембранском сепарационом јединицом и рецикулацијом, када је реч о примењеним претретманима, нису се показали као ефикасни, имајући у виду да су остварени степени инхибиције DPPH<sup>•</sup> радикала у фракцијама пептида <10 kDa и фракцији пептида >10 kDa еквивалентне у поређењу са вредностима хидролизата добијених ензимским поступком у шаржном реакторском систему (потпоглавље 7.1).

Способност реаговања добијених фракција пептида са слободним кисеоничним врстама испитана је на модел механизму у реакцији са хидроксил радикалом, једним од најјачих оксиданаса и најреактивнијом кисеоничном врстом



(Слика 7.35 а,б). Јасно се види да су највећу способност неутралисања  $\cdot\text{OH}$  радикала међу фракцијама пептида добијених хидролизом соницираних протеина беланцета испољиле фракције након 60 (**Ф5**), 105 (**Ф8**) и 120 минута хидролизе (**Ф9**) са вредностима степена неутралисања  $71,07 \pm 2,63$ ;  $76,36 \pm 2,61$  и  $71,00 \pm 2,58\%$ , редом. Након 60-ог минута дошло је до незнатног пада активности, али и даље је била задржана висока вредност супресије  $\cdot\text{OH}$  радикала ( $\sim 55\text{-}60\%$ ). Према неведеном може се истаћи да се хидролизом соницираних протеина у континуалном систему, константно ослобађају пептиди молекулске масе мање од 10 kDa са значајном способношћу реаговања са  $\cdot\text{OH}$  радикалима. Хидролизом термички претретираних протеина фракције пептида са највећом способношћу реаговања са кисоничном врстом изоловане су већ након 45-ог минута (**Ф4** –  $57,21 \pm 2,86\%$ ) у коме је остварен степен хидролизе 30%. Даљим током хидролизе и изоловањем фракција различитих профила пептида није забележено статистички значајно повећање вредности супресије хидроксил радикала, тако да се фракције пептида **Ф5**, **Ф7** и **Ф8** по својој активности ( $\sim 58\%$ ) изједначавају са фракцијом Ф4. Јасно је да су ове фракције пептида значајно мањи носиоци антиоксидативне активности у поређењу са фракцијама пептида хидролизата ултразвучно претретираних протеина беланцета. Ензимском хидролизом ултразвучно претретираних протеина беланцета у континуалном поступку у реактору са мембранском сепарационом јединицом и рецикулацијом, оставрени су већи приноси антиоксидативне активности, имајући у виду да су вредности степена неутралисања хидроксил радикала нативног, нехидролизованог и нетретираниог беланцета свега  $4,39 \pm 0,30\%$ , али и да су остварени степени инхибиције у фракцијама пептида <10 kDa и фракцији пептида >10 kDa идентични у поређењу са вредностима хидролизата добијених ензимским поступком у шаржном реакторском систему (потпоглавље 7.4).

Пошто су у претходним *in vitro* тестовим инхибиције слободних радикала и кисеоничне врсте потврђени антиоксидативни потенцијали фракција пептида, са разлогом је антиоксидативна активност верификована и одређивањем утицаја профила пептида у фракцијама на способност хелирања металних јона. Добијени резултати изражени су као степен хелирања јона  $\text{Fe}^{2+}$  (Слика 7.35 в,г). Способност хелирања  $\text{Fe}^{2+}$  јона фракција пептида добијених хидролизом протеина третираних ултразвучним таласима постепено расте са реакционим временом, све до 60-ог минута у коме фракција пептида молекулске масе <10 kDa (**Ф5**) успешно хелира  $\sim$

90% укупне количине  $\text{Fe}^{2+}$  јона. Даљим током хидролизе степен хелирања  $\text{Fe}^{2+}$  јона незнатно расте, тако да се међу фракцијама **Ф5 до Ф10** не уочавају статистички значајне разлике ( $p > 0,05$ ) и приписује им се вредност степена хелирања  $\sim 96\%$ . С тим у вези, евидентно је да су ензимском хидролизом ултразвучно претретираних протеина беланцета у континуалном поступку у реактору са мембранском сепарационом јединицом и рецикулацијом, оставрени већи приноси хелатне активности, имајући у виду да је вредност степена хелирања нативног, нехидролизованог и нетретираниог беланцета  $37,80 \pm 1,07\%$ , али и да су остварене вредности у фракцијама пептида  $< 10 \text{ kDa}$  и фракцији пептида  $> 10 \text{ kDa}$  еквивалентне у поређењу са вредностима хидролизата добијених ензимским поступком у шаржном реакторском систему (потпоглавље 7.4). Такође, висока способност хелирања  $\text{Fe}^{2+}$  јона ( $\sim 95\%$ ) измерена је у фракцијама пептида након 60-ог минута (**Ф5**) хидролизе термички претретираних протеина беланцета, након чега у реакционом времену није забележена значајнија промена ( $p > 0,05$ ), па је висока активност фракција пептида остварена све до краја процеса.

Генерално, на основу свих приказаних резултата антиоксидативне активности може се рећи да фракције пептида добијене током континуалне ензимске хидролизе ултразвучно претретираних протеина беланцета у мембранском реактору испољавају значајно боља и/или идентична антиоксидативна својства, највероватније услед уједначенијег састава пептида у њима, у поређењу са својствима хидролизата и/или ултрафилтрационих фракција пептида из шаржног поступка производње, као и у односу са фракцијама добијеним доливним тзв. семиконтинуалним мембранским процесом. Остварени су високи степени хидролизе ултразвучно претретираних протеина у поређењу са хидролизом термички третираних протеина, чије су фракције пептида испољиле слабију антиоксидативну активност, чиме је потврђено да ултразвучни претретман може бити адекватна замена конвенционалном термичком претретману процесирања протеина у индустрији. Фракције пептида молекуларне масе  $< 10 \text{ kDa}$  добијене континуалним мембранским поступком могу се као такве применити као нутрацеутици, суплементи фармацеутика или додаци функционалној храни, док фракције молекуларне масе  $> 10 \text{ kDa}$  могу се инкорпорирати у одређеним прехранбеним двофазним системима емулзија.

## 8. ЗАКЉУЧАК

Основни циљ истраживања ове докторске дисертације био је развој ензимског поступка производње биолошки активних пептида ултразвучно третираних нативних протеина беланцета, њихово изоловање и карактеризација. У оквиру наведеног, дефинисани су процесни параметри са циљем добијања биоактивних пептида у високом приносу, који су подразумевали оперативне параметре везане за дизајн и оптимизацију различитих врста реакторских система, као и оптимизацију ултразвучног претретмана нативних протеина беланцета. Нарочит допринос дат је разумевању између дужине и секвенце пептида протеина беланцета и њихових биолошких функција.

Најзначајнији закључци који произилазе из резултата приказаних у оквиру дисертације груписани су у неколико фаза. Конкретно:

**❖ Током оптимизације начина извођења и параметара ултразвучног претретмана са аспекта очувања биолошких својстава и субсеквентне ензимске хидролизе изведени су следећи закључци:**

- ❖ Степен неутралисања  $\text{DPPH}^{\bullet}$  радикала хидролизата протеина беланцета чији је био  $\text{H}$  8,6 (свеже беланце) побољшан је ултразвучним претретманом и накнадном хидролизом 7 пута у поређењу са нетретираним нативним беланцетом, на основу чега је свеже беланце без подешавања рН усвојено као најадекватнији извор пептида.
- ❖ Испитивањем корелације између интензитета и параметара ултразвучног претретмана (време третирања, амплитуда, фреквенца), тока ензимске хидролизе и оствареног степена хидролизе протеина беланцета као оптимално усвојено је време претретмана 15 минута, за ултразвучно купатило ( $40 \pm 2$  kHz) и ултразвучну сонду ( $20 \pm 0,2$  kHz).
- ❖ Хидролизом ултразвучно третираних протеина беланцета у једноступеном и двоступеном ензимском поступку, произведени су хидролизати значајно већих вредности степена неутралисања  $\text{DPPH}^{\bullet}$  радикала и редукујуће моћи у поређењу са вредностима нетретираних нативних протеина.
- ❖ Сагледавањем вредности остварених брзина ензимске реакције, равнотежних степена хидролизе и антиоксидативне активности, једноступена хидролиза беланцета у шаржном реактору са мешањем катализована алкалазом, и

двостепена ензимска хидролиза катализована алкалазом и флеворзимом, усвојене су као најефикасније.

❖ **Током испитивања кинетике ензимске реакције у шаржном реакторском систему изведени су следећи закључци:**

- ❖ Добра сагласност експерименталних резултата и предвиђених теоријских вредности ( $p < 0,05$ ) указала је на чињеницу да се ток хидролизе ултразвучно претретираних протеина беланцета поуздано може описати полу-емпиријским кинетичким моделом који узима у обзир дезактивацију ензима и инхибицију супстратом у вишку у складу са кинетиком другог реда.
- ❖ Смањење инхибиције ензима супстратом, повећање активности ензима и брзине реакције указали су на побољшање ензимске хидролизе протеина беланцета након оба тестирана ултразвучна претретмана, чиме је и квантитативно доказан позитиван ефекат ултразвучних претретмана.
- ❖ Поређењем израчунатих вредности константи брзине реакције,  $k_2$ , претретман изведен ултразвучном сондом условио је највеће повећања брзине реакције у односу на остале претретмане.
- ❖ Ултразвучни претретман протеина беланцета испољио је значајано дејство на карактеристике колоидних система протеина: величину агрегата, униформност, хидрофобност и наелектрисање, утичући на садржај сулфхидрилних група и доступност пептидних веза ензимској хидролизи, а следствено и на кинетику реакције хидролизе.
- ❖ Ултразвучни претретмани, посебно претретман изведен ултразвучном сондом, повећавају афинитет алкалазе и/или комбинације алкалаза и флеворзим према протеинима беланцета, повећавају константе брзине реакције ензимске хидролизе ( $k_2$ ), а смањују енергију активације ( $E_a$ ), енталпију ( $\Delta H$ ), ентропију ( $\Delta S$ ) и Гибсову слободну енергију ( $\Delta G$ ).

❖ **Током ултрафилтрационог фракционисања хидролизата протеина беланцета изведени су следећи закључци:**

- ❖ Пептиди, садржани у припремљеним хидролизатима, могу се понашати као доноси електрона и реаговати са  $ABTS^{+}$  радикалским катјоном прекидајући ланчану радикалску реакцију преводећи радикалски катјон у стабилан и неактиван производ.

- ❖ Издвојен је и усвојен степен хидролизе 28% као најоптималнији за производњу хидролизата богатих антиоксидативним пептидима.
  - ❖ Показано је да је задржавање одређених делова секундарне структуре протеина беланцета, која се налази у дужим олигопептидима и/или деловима структуре у полипептидима, неопходно за изразиту антиоксидативну активност.
  - ❖ На основу расподеле молекулских маса са електрофореграма, ултрафилтрационо раздвајање хидролизата извршено је мембранама различитих величина пора (30, 10, 3 и 1 kDa).
  - ❖ Удео пептидних фракција са пептидима молекулске масе мање од 10 kDa изолованих из хидролизата протеина претретираних ултразвучним таласима фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz, генерисаних ултразвучном сондом, знатно је већи ( $p < 0,05$ ) у поређењу са претретманом у ултразвучном купатилу фреквенце таласа  $40 \pm 2$  kHz и термичким претретманом на  $75$  °C у току 15 минута.
- ❖ Током карактеризације изолованих фракција пептида и утврђивања реалације између састава и величине пептида и једне од биолошких активности изведени су следећи закључци:**
- ❖ Карактеризацијом са аспекта одређивања способности инхибиције реактивних кисеоничних врста и слободних радикала, фракције пептида молекулских маса 3-10 и 1-3 kDa, изоловане из хидролизата протеина беланцета соницираних ултразвучном сондом, поседују изузетне способности супресије слободних радикалских група као што су ABTS<sup>•+</sup> радикал катјон, хидроксил радикал ( $\cdot\text{OH}$ ), и супероксид анјонски радикал ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), значајно израженије од способности полазног хидролизата и фракција пептида  $>10$  kDa и  $<1$  kDa, као и других анализираних фракција.
  - ❖ Претпостављено је да ове фракције пептида поседују висок садржај поларних, ароматичних и хидрофобних аминокиселинских остатака, али и да постоји корелација између садржаја аминокиселина и величине пептида са способношћу инхибирања слободних радикала.
  - ❖ Хидролизат протеина беланцета претретираних ултразвучном сондом, нарочито изоловане фракције пептида малих молекулских маса, испољавају значајан антиоксидативни капацитет за тзв. „хватање“ атома водоника са угљеника метиленске групе полинезасићене масне киселине и тако инхибирају пероксидацију линолне киселине.

- ❖ Изоловане фракције пептида, нарочито фракције пептида молекулске масе <3 kDa, додате у липидну емулзију  $\beta$ -каротен-линолна киселина ефикасније су инхибирале формирање пероксил радикала током 120 минута инкубације у поређењу са контролним узорком нативног нетретираниог беланцета.
- ❖ Фракције пептида велике молекулске масе садржане од полипептида имају мању способност хелирања  $Fe^{2+}$  јона у поређењу са фракцијама које садрже ди- и три- и олигопептиде, односно пептиде са 2-6 аминокиселинска остатка, међу којима се не запажа значајна разлика ( $p > 0,05$ ) у иначе високом степену хелирања  $Fe^{2+}$  јона.
- ❖ Антипролиферативни ефекат хидролизата нативних протеина беланцета и изолованих фракција пептида (3-10 kDa) зависи од типа туморске ћелијске линије, примењене концентрације пептида и времена инкубације. Најизражајнији ефекат на ћелијске линије аденокарцинома дојке и колоректалног аденокарцинома испољили су узорци изолованих ултрафилтрационих фракција пептида, у којима су нативни протеини беланцета непосредно пре ензимске хидролизе били подвргнути кавитационом ефекту ( $20 \pm 0,2$  kHz).
- ❖ Најмања пролиферација изражена је при концентрацијама узорака протеинских хидролизата и фракције пептида од  $35,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  и инкубацији од 72 сата за хумане ћелије аденокарцинома MCF-7 и SW480.
- ❖ У одабраном распону концентрација и времена инкубације хидролизати ултразвучно претретираних протеина беланцета и њихове фракције пептида молекулске масе 3-10 kDa не испољавају инхибиторни ефекат на пролиферацију мезенхималних матичних PDLSC ћелија, што указује да анализирани узорци пептида немају токсичан ефекат на здраве матичне ћелије.
- ❖ Пирсоновом корелационом анализом утврђена је значајна корелација између антиоксидативне и антипролиферативне активности узорака хидролизата протеина беланцета претретираних различитом врстом ултразвука и/или њихових изолованих фракција пептида молекулске масе 3-10 kDa.
- ❖ Изоловани пептиди не поседују инхибиторну активност према ћелијама квасца *C. albicans*, али испољавају антибактеријску активност, нарочито према патогеној Грам-позитивној *S. aureus*. Ултразвучним претретманом фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz протеина беланцета и њиховом субсеквентном хидролизом алкалазом, као и

применом ултрафилтрације (фракције пептида молекулске масе 3-10 и 1-3 kD) значајно је повећана антимикробна активност у поређењу са нативним нетретираним беланцем.

- ❖ Фракције пептида молекулских маса 3-10 и 1-3 kDa, изоловане из хидролизата протеина беланца претретираних ултразвучном сондом испољиле су највеће антихипертензивне активности.
- ❖ Пептиди протеина беланца поседују одређен ниво антикоагулативне активности која је најизраженија у случају пептида молекулске масе 1-3 kDa у случају свих претретмана.
- ❖ Пречишћавање изолованих најактивнијих биолошки активних фракција пептида извршено је применом гел-филтрационе хроматографије, а карактеризацијом нових фракција потврђена је висока антиоксидативна активност пептида оних узорака који су били припремљени од полазних протеина беланца претретираних ултразвуком високог интензитета.
- ❖ **Током оптимизације начина извођења процеса и конфигурације мембранског реакторског система (10 kDa) са рецикулацијом и карактеризације добијених фракција пептида изведени су следећи закључци:**
  - ❖ Увођењем континуалног поступка у коме је ултразвучно прететиран свеж супстрат протеина беланца све време довођен у реакциони суд са мешањем протоком којим је истицао пермеат није забележено концентровање супстрата, а остварени су значајно већи просторно-временски приноси реактора у односу на доливни тзв. семиконтинулани мембрански процес.
  - ❖ Смањена је инхибиција алкалазе супстратом у вишку услед континуалног довођења ултразвучно претретираних протеина знатно веће конформационе покретљивости и доступности ензиму.
  - ❖ Очигледно је и смањење инхибиције ензима производом реакције јер су се пептиди мањи од 10 kDa уклањали из система и сакупљали као пермеати, чиме је спречено нагомилавање производа у ензимском реактору.
  - ❖ Остварена је могућност добијања фракција пептида тачно одређених антиоксидативних својстава, која је значајно боља и/или идентична, у поређењу са својствима хидролизата и/или ултрафилтрационих фракција

пептида из шарженог поступка, највероватније услед уједначенијег састава пептида у њима.

Резултати добијени истраживањем у оквиру ове докторске дисертације дају значајан допринос изоловању и карактеризацији биоактивних пептида из нативног беланцета, као и унапређењу производње хидролизата (смеше ди-, три- и олигопептида) ензимском хидролизом ултразвучно претретираних нативних протеина беланцета. Експериментални резултати указали су на корелације између механизма деловања ултразвучних таласа, механизма деловања протеолитичких ензима и биолошке активности добијених хидролизата и/или биоактивних фракција пептида. Значајан допринос чине и корелације између антиоксидативне и анти туморске активности, антихипертензивне и антиоксидативне активности најактивнијих фракција пептида. Такође, дефинисани су параметри при третирању протеина беланцета ултразвуком високог интензитета и развијен је ефикасан континуални мембрански ензимски процес за производњу фракција пептида дефинисаног састава и са антиоксидативном активношћу у великом приносу.

Добијене фракције пептида, како у шарженом тако и у континуалном мембранском поступку са високим вредностима биолошких активности, могу се користити као функционални додаци храни где би имали улогу природних конзерванаса хране који спречавају пероксидацију липида и повећавају свежину намирница. Такође, могу се употребити у формулисању дијететских формулација у којима би пептиди већих молекулских маса улазили у састав прехранбених суплемената на бази протеина беланцета, док би пептиди мањих молекулских маса нашли примену као фармацеутици и/или нутрацеутици.



## 9. РЕФЕРЕНЦЕ

1. de Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2015). Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*, 74, 185-198.
2. Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266(1-2), 37-56.
3. You, L., Zhao, M., Liu, R. H., & Regenstein, J. M. (2011). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) Peptides Prepared by Papain Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7948-7953.
4. Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.
5. Ajibola, C. F., Fashakin, J. B., Fagbemi, T. N., & Aluko, R. E. (2011). Effect of Peptide Size on Antioxidant Properties of African Yam Bean Seed (*Sphenostylis stenocarpa*) Protein Hydrolysate Fractions. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), 6685-6702.
6. Daliri, E. B.-M., Oh, D. H., & Lee, B. H. (2017). Bioactive Peptides. *Foods*, 6(5), 32.
7. Mine, Y. (1995). Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 6(7), 225-232.
8. Mine, Y., & Kovacs-Nolan, J. (2006). New insights in biologically active proteins and peptides derived from hen egg. *World's Poultry Science Journal*, 62(1), 87-96.
9. 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.
10. Pellegrini, A., Hülsmeier, A. J., Hunziker, P., & Thomas, U. (2004). Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1672(2), 76-85.
11. 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.
12. Teodorowicz, M., Van Neerven, J., & Savelkoul, H. (2017). Food processing: The influence of the Maillard Reaction on immunogenicity and allergenicity of food proteins. *Nutrients*, 9(8), 835.
13. Manning, M. C., Chou, D. K., Murphy, B. M., Payne, R. W., & Katayama, D. S. (2010). Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharmaceutical research*, 27(4), 544-575.
14. Ozuna, C., Paniagua-Martínez, I., Castaño-Tostado, E., Ozimek, L., & Amaya-Llano, S. L. (2015). Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides. *Food Research International*, 77, Part 4, 685-696.
15. Arzeni, C., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2015). Power Ultrasound Assisted Design of Egg Albumin Nanoparticles. *Food Biophysics*, 10(4), 439-446.
16. 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(0), 15-23.
17. Hektoen, L., & Cole, A. G. (1928). The Proteins of Egg White: The Proteins in Egg White and Their Relationship to the Blood Proteins of the Domestic Fowl as Determined by the Precipitin Reaction. *The Journal of Infectious Diseases*, 1-24.

18. Osborne, T. B., & Campbell, G. F. (1900). The protein constituents of egg white. *Journal of the American Chemical Society*, 22(7), 422-450.
19. Stadelman, W. J., Newkirk, D., & Newby, L. (1995). *Egg Science and Technology, Fourth Edition*. Taylor & Francis.
20. Karimpil, J. J., Melo, J., & D'Souza, S. (2011). Hen egg white as a feeder protein for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71(3-4), 113-118.
21. Gulla, K., Gouda, M., Thakur, M., & Karanth, N. (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.
22. Kubal, B., & D'Souza, S. (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.
23. 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.
24. Stevens, L. (1991). Egg white proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 100(1), 1-9.
25. Doi, E., & Kitabatake, N. (1997). Structure and functionality of egg proteins. In S. Damodaren & A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their applications* (pp. 325-340). New York: Mercel Dekker.
26. Ngarize, S., Herman, H., Adams, A., & Howell, N. (2004). Comparison of changes in the secondary structure of unheated, heated, and high-pressure-treated  $\beta$ -lactoglobulin and ovalbumin proteins using Fourier transform Raman spectroscopy and self-deconvolution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21), 6470-6477.
27. Huntington, J. A., & Stein, P. E. (2001). Structure and properties of ovalbumin. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 756(1-2), 189-198.
28. Kilara, A., & Harwalkar, V. R. (1996). Denaturation. In S. Nakai & H. W. Modler (Eds.), *Food Proteins: Properties and Characterization*, (pp. 136-148). New Yourk: VCH Publishers.
29. Fevold, H. L. (1951). Egg Proteins. In M. L. Anson, J. T. Edsall & K. Bailey (Eds.), *Advances in Protein Chemistry*, vol. 6 (pp. 187-252): Academic Press.
30. Nakamura, R., & Doi, E. (1996). Egg processing. In S. Nakai & H. W. Modler (Eds.), *Food Proteins: Properties and Characterization*, (pp. 171-207). New York: VCH Publishers.
31. Mizutani, K., Toyoda, M., & Mikami, B. (2012). X-ray structures of transferrins and related proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(3), 203-211.
32. Mizutani, K., Mikami, B., & Hirose, M. (2001). Domain closure mechanism in transferrins: new viewpoints about the hinge structure and motion as deduced from high resolution crystal structures of ovotransferrin N-lobe11Edited by R. Huber. *Journal of molecular biology*, 309(4), 937-947.
33. 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.
34. Yokota, T., Ohishi, H., & Watanabe, K. (1999). Antitumor effects of beta-subunit from egg white ovomucin on xenografted sarcoma-180 cells in mice. *Food Science and Technology Research*, 5(3), 279-283.
35. Huopalahti, R. (2007). Ovomucin. In R. Huopalahti, M. Anton, R. López-Fandiño & R. Schade (Eds.), *Bioactive egg compounds*, (pp. 61-68). Berlin: Springer, Heidelberg.

36. Wang, J., & Wu, J. (2012). Effect of operating conditions on the extraction of ovomucin. *Process Biochemistry*, 47(1), 94-98.
37. Liu, Y.-F., Oey, I., Bremer, P., Carne, A., & Silcock, P. (2017). Bioactive peptides derived from egg proteins: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-23.
38. Lesnierowski, G., & Kijowski, J. (2007). Lysozyme. In R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton & R. Schade (Eds.), *Bioactive Egg Compounds*, (pp. 33-42). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
39. Oostenbrink, C., Soares, T., Van der Vegt, N. F. A., & Van Gunsteren, W. F. (2005). Validation of the 53A6 GROMOS force field. *European Biophysics Journal*, 34(4), 273-284.
40. Papamokos, E., Weber, E., Bode, W., Huber, R., Empie, M. W., Kato, I., & Laskowski, M. (1982). Crystallographic refinement of Japanese quail ovomucoid, a Kazal-type inhibitor, and model building studies of complexes with serine proteases. *Journal of molecular biology*, 158(3), 515-537 (Прейзето ca <https://www.chemistryviews.org/details/ezone/1492619/>.html).
41. Nau, F., Guérin-Dubiard, C., & Croguennec, T. (2007). Avidin. In R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton & R. Schade (Eds.), *Bioactive Egg Compounds*, (pp. 75-80). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
42. Liu, W.-H., Means, G. E., & Feeney, R. E. (1971). The inhibitory properties of avian ovoidin against proteolytic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 229(1), 176-185.
43. López-Fandiño, R., Recio, I., & Ramos, M. (2007). Egg-protein-derived peptides with antihypertensive activity. In *Bioactive egg compounds*, (pp. 199-211): Springer.
44. Anastasi, A., Brown, M., Kembhavi, A., Nicklin, M., Sayers, C. A., Sunter, D., & Barrett, A. (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.
45. Guo, A. (2015). Comparative analysis of cystatin superfamily in platyhelminths. *PLOS ONE*, 10(4), e0124683.
46. Ketterer, B. (1965). Ovoglycoprotein, a protein of hen's-egg white. *Biochemical Journal*, 96(2), 372-376.
47. Kitamoto, T., Nakashima, M., & Ikai, A. (1982). Hen egg white ovomacroglobulin has a protease inhibitory activity. *The Journal of Biochemistry*, 92(5), 1679-1682.
48. Geng, F., Huang, X., Yan, N., Jia, L., & Ma, M. (2013). Purification of hen egg white ovomacroglobulin using one-step chromatography. *Journal of Separation Science*, 36(23), 3717-3722.
49. 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.
50. Monaco, H. L. (1997). Crystal structure of chicken riboflavin-binding protein. *The EMBO Journal*, 16(7), 1475-1483.
51. Meir, A., Edward, B., & Livnah, O. (2012). Structural Adaptation of a Thermostable Biotin-binding Protein in a Psychrophilic Environment. *Journal of Biological Chemistry*, 287(22), 17951-17962.
52. Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M.-C., & Mora, L. (2018). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*, 267, 395-404.
53. Tavano, O. L., Berenguer-Murcia, A., Secundo, F., & Fernandez-Lafuente, R. (2018). Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(2), 412-436.

54. Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.
55. Danquah, M., & Agyei, D. (2012). Pharmaceutical applications of bioactive peptides. *OA biotechnology*, 1(2), 1-7.
56. Samaranayaka, A. G., & Li-Chan, E. C. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 229-254.
57. Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F., & Nokihara, K. (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2619-2623.
58. Tsuge, N., Eikawa, Y., Nomura, Y., Yamamoto, M., & Sugisawa, K. (1991). Antioxidative Activity of Peptides Prepared by Enzymatic Hydrolysis of Egg-white Albumin. *Nippon Nōgeikagaku Kaishi*, 65(11), 1635-1641.
59. Suetsuna, K., & CHEN, J.-R. (2002). Isolation and characterization of peptides with antioxidant activity derived from wheat gluten. *Food Science and Technology Research*, 8(3), 227-230.
60. Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B., & López-Fandiño, R. (2004). Antioxidant Activity of Peptides Derived from Egg White Proteins by Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67(9), 1939-1944.
61. Baratzadeh, M.-H., Asoodeh, A., & Chamani, J. (2013). Antioxidant peptides obtained from goose egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(8), 1603-1609.
62. Chen, C., Chi, Y.-J., Zhao, M.-Y., & Lv, L. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate. *Amino Acids*, 43(1), 457-466.
63. Nimalaratne, C., Bandara, N., & Wu, J. (2015). Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. *Food Chemistry*, 188, 467-472.
64. Xia, Y., Bamdad, F., Gänzle, M., & Chen, L. (2012). Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, 134(3), 1509-1518.
65. Umayaparvathi, S., Arumugam, M., Meenakshi, S., Dräger, G., Kirschning, A., & Balasubramanian, T. (2014). Purification and characterization of antioxidant peptides from oyster (*Saccostrea cucullata*) hydrolysate and the anticancer activity of hydrolysate on human colon cancer cell lines. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 20(2), 231-243.
66. Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., & Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588-593.
67. Tang, X., He, Z., Dai, Y., Xiong, Y. L., Xie, M., & Chen, J. (2009). Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 587-593.
68. Zhang, J., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., Wang, X., & Yao, H. (2010). Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS. *Food Chemistry*, 119(1), 226-234.
69. Bhat, Z., Kumar, S., & Bhat, H. F. (2015). Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5377-5392.

70. Perez Espitia, P. J., de Fátima Ferreira Soares, N., dos Reis Coimbra, J. S., de Andrade, N. J., Souza Cruz, R., & Alves Medeiros, E. A. (2012). Bioactive peptides: synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 187-204.
71. Shahidi, F., & Zhong, Y. ((2008)). Bioactive Peptides. *Journal of AOAC International*, 91(4), 914-931.
72. Acharya, K. R., Sturrock, E. D., Riordan, J. F., & Ehlers, M. R. W. (2003). Ace revisited: A new target for structure-based drug design. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 891.
73. Iwaniak, A., Minkiewicz, P., & Darewicz, M. (2014). Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 114-134.
74. Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 163-169.
75. Bhat, Z., Kumar, S., & Bhat, H. F. (2015). Bioactive peptides from egg: a review. *Nutrition & Food Science*, 45(2), 190-212.
76. Zambrowicz, A., Timmer, M., Polanowski, A., Lubec, G., & Trziszka, T. (2013). Manufacturing of peptides exhibiting biological activity. *Amino Acids*, 44(2), 315-320.
77. Knežević-Jugović, Z. (2008). *Enzimsko inženjerstvo: Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd*.
78. Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*: Elsevier Applied Science Publishers.
79. 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.
80. Valencia, P. L., Flores, S. A., Pinto, M. J., & Almonacid, S. F. (2016). Analysis of the operational strategies for the enzymatic hydrolysis of food proteins in batch reactor. *Journal of Food Engineering*, 176, 121-127.
81. Saha, B. C., & Hayashi, K. (2001). Debittering of protein hydrolyzates. *Biotechnology Advances*, 19(5), 355-370.
82. Lalasidis, G. (1978). Four new methods of debittering protein hydrolysates and a fraction of hydrolysates with high content of essential amino acids. In *Annales de la nutrition et de l'alimentation*, vol. 32 (pp. 709-723).
83. Pedersen, B. (1994). Removing bitterness from protein hydrolysates. *Food Technology*, 48(10), 96-98.
84. Silvestre, M. (1997). Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 60(2), 263-271.
85. Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256-1262.
86. Satake, K., Okuyama, T., Ohashi, M., & Shinoda, T. (1960). The spectrophotometric determination of amine, amino acid and peptide with 2,4,6- trinitrobenzene 1-sulfonic acid. *Journal of Biochemistry*, 47(5), 654-660.
87. Church, F. C., Porter, D. H., Catignani, G. L., & Swaisgood, H. E. (1985). An o-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Analytical Biochemistry*, 146(2), 343-348.
88. Schwartz, T. B., & Engel, F. L. (1950). A photometric ninhydrin method for the measurement of proteolysis. *The Journal of biological chemistry*, 184(1), 197-202.

89. Mat, D. J. L., Cattenoz, T., Souchon, I., Michon, C., & Le Feunteun, S. (2018). Monitoring protein hydrolysis by pepsin using pH-stat: In vitro gastric digestions in static and dynamic pH conditions. *Food Chemistry*, *239*, 268-275.
90. Fernández, A., & Kelly, P. (2016). pH-stat vs. free-fall pH techniques in the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Food Chemistry*, *199*, 409-415.
91. Cheison, S. C., Zhang, S.-B., Wang, Z., & Xu, S.-Y. (2009). Comparison of a modified spectrophotometric and the pH-stat methods for determination of the degree of hydrolysis of whey proteins hydrolysed in a tangential-flow filter membrane reactor. *Food Research International*, *42*(1), 91-97.
92. Navarrete del Toro, M. A., & García-Carreño, F. L. (2003). Evaluation of the progress of protein hydrolysis. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, *10*(1), B2. 2.1-B2. 2.14.
93. Ren, Y., Wu, H., Li, X., Lai, F., Zhao, G., & Xiao, X. (2014). A Two-Step, One-Pot Enzymatic Method for Preparation of Duck Egg White Protein Hydrolysates with High Antioxidant Activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *172*(3), 1227-1240.
94. 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).
95. Miguel, M., Recio, I., Gomez-Ruiz, J. A., Ramos, M., & López-Fandiño, R. (2004). Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptides Derived from Egg White Proteins by Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Food Protection*, *67*(9), 1914-1920.
96. Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Yu, Y., Liu, B., Liu, J., & Chen, F. (2011). Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. *Food Chemistry*, *129*(4), 1376-1382.
97. 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.
98. Cigić, B., & Zelenik-Blatnik, M. (2004). Preparation and characterization of chicken egg white hydrolysate. *Acta Chimica Slovenica*, *51*(1), 177-188.
99. Liu, P. W., Liu, H. P., & Chen, L. (2013). Two-step enzymatic hydrolysis for preparation of peptides from sunflower (*Helianthus annuus L.*) protein isolates. *Modern Food Science and Technology*, *29*(4), 829-834.
100. Wróblewska, B., Jedrychowski, L., Szabó, E., & Hajós, G. (2005). The reduction of cow milk proteins immunoreactivity by two-step enzymatic hydrolysis. *Acta Alimentaria*, *34*(3), 307-315.
101. Damodaran, S., & Li, Y. (2017). A two-step enzymatic modification method to reduce immuno-reactivity of milk proteins. *Food Chemistry*, *237*, 724-732.
102. Lee, J. H., Moon, S. H., Kim, H. S., Park, E., Ahn, D. U., & Paik, H.-D. (2017). Antioxidant and anticancer effects of functional peptides from ovotransferrin hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(14), 4857-4864.
103. Rawlings, N. D. (2013). Protease families, evolution and mechanism of action. In K. Brix & W. Stöcker (Eds.), *Proteases: structure and function*, (pp. 1-36). Vienna: Springer.
104. Sandhya, C., Sumantha, A., & Pandey, A. (2006). Proteases. In A. Pandey, C. Webb, C. R. Soccol & C. Larroche (Eds.), *Enzyme technology*, (pp. 319-333). New Delhi: Springer; Asiatech Publishers, Inc.
105. Rawlings, N. D., & Salvesen, G. (2013). *Handbook of Proteolytic Enzymes, Third Edition*. London: Elsevier; Academic Press.

106. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597-635.
107. 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, Design and Selection*, 4(7), 719-737.
108. Polgár, L. (2013). Chapter 560 - Catalytic Mechanisms of Serine and Threonine Peptidases. In N. D. Rawlings & G. Salvesen (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*, (pp. 2524-2534): Academic Press.
109. Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, 102(12), 4501-4524.
110. Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (2013). Chapter 404 - Introduction: The Clans and Families of Cysteine Peptidases. In N. D. Rawlings & G. Salvesen (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*, (pp. 1743-1773): Academic Press.
111. Polgár, L. (2013). Chapter 405 - Catalytic Mechanisms of Cysteine Peptidases. In N. D. Rawlings & G. Salvesen (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*, (pp. 1773-1784): Academic Press.
112. Wlodawer, A., Gustchina, A., & James, M. N. G. (2013). Chapter 2 - Catalytic Pathways of Aspartic Peptidases. In N. D. Rawlings & G. Salvesen (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*, (pp. 19-26): Academic Press.
113. Valencia, P., Pinto, M., & Almonacid, S. (2014). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry*, 49(2), 258-264.
114. Graycar, T. P., Bott, R. R., Power, S. D., & Estell, D. A. (2013). Chapter 693 - Subtilisins. In N. D. Rawlings & G. Salvesen (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*, (pp. 3148-3155): Academic Press.
115. 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.
116. Hunkapiller, M. W., Forgac, M. D., & Richards, J. H. (1976). Mechanism of action of serine proteases: tetrahedral intermediate and concerted proton transfer. *Biochemistry*, 15(25), 5581-5588.
117. Chen, S.-T., Chen, S., Hsiao, S., & Wang, K.-T. (1991). Application of industrial protease "Alcalase" in peptide synthesis. *Biomedica biochimica acta*, 50(10-11), S181-186.
118. Matsui, M., Fowler, J. H., & Walling, L. L. (2006). Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biological chemistry*, 387(12), 1535-1544.
119. Delange, R. J., & Smith, E. L. (1971). Leucine Aminopeptidase and Other N-Terminal Exopeptidases. In *The enzymes*, vol. 3 (pp. 81-118): Elsevier.
120. Vasantha, N., Thompson, L., 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.
121. Clapés, P., Pera, E., & Torres, J. (1997). Peptide bond formation by the industrial protease, neutrase, in organic media. *Biotechnology Letters*, 19(10), 1023-1026.
122. Preuzeto sa stranice [http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/8300/9/09\\_chapter%202.pdf](http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/8300/9/09_chapter%202.pdf) (datum preuzimanja 20.8.2018.).

123. Storer, A. C., & Ménard, R. (2013). Chapter 419 - Papain. In N. D. Rawlings & G. Salvesen (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*, (pp. 1858-1861): Academic Press.
124. Mótyán, J. A., Tóth, F., & Tózsér, J. (2013). Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules*, 3(4), 923-942.
125. Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90(0), 1-11.
126. Richards, F. M. (1955). Titration of amino groups released during the digestion of ribonuclease by subtilisin. *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg. Serie chimique*, 29(17-19), 322.
127. Ottesen, M. (1956). The Conversion of Ovalbumin into Plakalbumin, as Followed in the pH-stat. *Archives of biochemistry and biophysics*, 65(1), 70-77.
128. Biszku, E., Sajgó, M., Solti, M., & Szabolcsi, G. (1973). On the mechanism of formation of a partially active aldolase by tryptic digestion. *European journal of biochemistry*, 38(2), 283-292.
129. Demirhan, E., Apar, D. K., & Özbek, B. (2011). A kinetic study on sesame cake protein hydrolysis by Alcalase. *Journal of Food Science*, 76(1), C64-C67.
130. Vorob'ev, M., Levicheva, I. Y., & Belikov, V. (1996). Kinetics of the initial stage of milk protein hydrolysis by chymotrypsin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 32(2), 219-222.
131. González-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E., Páez, M. P., & Guadix, E. M. (1994). Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(4), 523-528.
132. Qi, W., & He, Z. (2006). Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model. *Frontiers of Chemistry in China*, 1(3), 308-314.
133. Márquez, M. C., & Vázquez, M. A. (1999). Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 35(1-2), 111-117.
134. 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.
135. 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.
136. Mason, T. (1998). Power ultrasound in food processing—the way. *Ultrasound in food processing*, 105.
137. 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.
138. O'Brien, W. D. (2007). Ultrasound—biophysics mechanisms. *Progress in biophysics and molecular biology*, 93(1-3), 212-255.
139. Araújo, J., Oliveira, E., Kouvonon, P., Corthals, G., Lodeiro, C., Santos, H., & Capelo, J. (2014). A journey through PROTEOSONICS. *Talanta*, 121, 71-80.
140. 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.
141. Martini, S. (2013). An overview of ultrasound. In S. Martini (Ed.), *Sonocrystallization of Fats*, (pp. 7-16): Springer.
142. 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.



143. 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.
144. 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.
145. Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., & Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48(2), 410-427.
146. Hu, H., Wu, J., Li-Chan, E. C. Y., Zhu, L., Zhang, F., Xu, X., Fan, G., Wang, L., Huang, X., & Pan, S. (2013). Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. *Food Hydrocolloids*, 30(2), 647-655.
147. Lei, B., Majumder, K., Shen, S., & Wu, J. (2011). Effect of sonication on thermolysin hydrolysis of ovotransferrin. *Food Chemistry*, 124(3), 808-815.
148. Xiong, W., Wang, Y., Zhang, C., Wan, J., Shah, B. R., Pei, Y., Zhou, B., Li, J., & Li, B. (2016). High intensity ultrasound modified ovalbumin: Structure, interface and gelation properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 302-309.
149. Krise, K. M., Forsyth, E. R., DiMarco, K. M., & Milosavljevic, B. H. (2013). Sonolysis of High Macroviscosity Systems: Hen Albumen Hydrogel. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(24), 7164-7168.
150. Chandrapala, J., Zisu, B., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2012). The effects of high-intensity ultrasound on the structural and functional properties of  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -Lactoglobulin and their mixtures. *Food Research International*, 48(2), 940-943.
151. Jin, J., Ma, H., Wang, K., Yagoub, A. E.-G. A., Owusu, J., Qu, W., He, R., Zhou, C., & Ye, X. (2015). Effects of multi-frequency power ultrasound on the enzymolysis and structural characteristics of corn gluten meal. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24(0), 55-64.
152. Wang, Y., Wang, Z., Handa, C. L., & Xu, J. (2017). Effects of ultrasound pre-treatment on the structure of  $\beta$ -conglycinin and glycinin and the antioxidant activity of their hydrolysates. *Food Chemistry*, 218, 165-172.
153. 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, Part 3(0), 386-396.
154. 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.
155. Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., & Krešić, G. (2010). Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of  $\alpha$ -lactalbumin. *LWT - Food Science and Technology*, 43(2), 254-262.
156. Capelo, J., Carreira, R., Diniz, M., Fernandes, L., Galesio, M., Lodeiro, C., Santos, H., & Vale, G. (2009). Overview on modern approaches to speed up protein identification workflows relying on enzymatic cleavage and mass spectrometry-based techniques. *Analytica chimica acta*, 650(2), 151-159.
157. Switzar, L., Giera, M., & Niessen, W. M. (2013). Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. *Journal of proteome research*, 12(3), 1067-1077.
158. López-Ferrer, D., Heibeck, T. H., Petritis, K., Hixson, K. K., Qian, W., Monroe, M. E., Mayampurath, A., Moore, R. J., Belov, M. E., & Camp, D. G. (2008). Rapid sample processing for LC-MS-based quantitative proteomics using high intensity focused ultrasound. *Journal of proteome research*, 7(9), 3860-3867.

159. Ishimori, Y., Karube, I., & Suzuki, S. (1981). Acceleration of immobilized  $\alpha$ -chymotrypsin activity with ultrasonic irradiation. *Journal of molecular catalysis*, 12(2), 253-259.
160. Kashkooli, H. A., Rooney, J. A., & Roxby, R. (1980). Effects of ultrasound on catalase and malate dehydrogenase. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 67(5), 1798-1801.
161. Kwiatkowska, B., Bennett, J., Akunna, J., Walker, G. M., & Bremner, D. H. (2011). Stimulation of bioprocesses by ultrasound. *Biotechnology Advances*, 29(6), 768-780.
162. 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.
163. Yu, Z.-L., Zeng, W.-C., Zhang, W.-H., Liao, X.-P., & Shi, B. (2014). Effect of ultrasound on the activity and conformation of  $\alpha$ -amylase, papain and pepsin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(3), 930-936.
164. Rial-Otero, R., Carreira, R. J., Cordeiro, F. M., Moro, A. J., Santos, H. M., Vale, G., Moura, I., & 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(1-2), 101-107.
165. Moulton, K., & Wang, L. (1982). A pilot-plant study of continuous ultrasonic extraction of soybean protein. *Journal of Food Science*, 47(4), 1127-1129.
166. Zhu, K.-X., Sun, X.-H., & Zhou, H.-M. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of defatted wheat germ proteins by reverse micelles. *Journal of Cereal Science*, 50(2), 266-271.
167. Chittapalo, T., & Noomhorm, A. (2009). Ultrasonic assisted alkali extraction of protein from defatted rice bran and properties of the protein concentrates. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(9), 1843-1849.
168. Dong, X. Y., Guo, L. L., Wei, F., Li, J. F., Jiang, M. L., Li, G. M., Zhao, Y. D., & Chen, H. (2011). Some characteristics and functional properties of rapeseed protein prepared by ultrasonication, ultrafiltration and isoelectric precipitation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(8), 1488-1498.
169. Shirsath, S., Sonawane, S., & Gogate, P. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 53, 10-23.
170. 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.
171. Zhou, C., Ma, H., Yu, X., Liu, B., Yagoub, A. E.-G. A., & Pan, Z. (2013). Pretreatment of defatted wheat germ proteins (by-products of flour mill industry) using ultrasonic horn and bath reactors: Effect on structure and preparation of ACE-inhibitory peptides. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(6), 1390-1400.
172. Yu, L., Sun, J., Liu, S., Bi, J., Zhang, C., & Yang, Q. (2012). Ultrasonic-assisted enzymolysis to improve the antioxidant activities of peanut (*Arachin conarachin L.*) antioxidant hydrolysate. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 9051-9068.
173. Zhu, K.-X., Su, C.-Y., Guo, X.-N., Peng, W., & Zhou, H.-M. (2011). Influence of ultrasound during wheat gluten hydrolysis on the antioxidant activities of the resulting hydrolysate. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(5), 1053-1059.

174. Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochemistry*, 41(2), 447-456.
175. Charcosset, C. (2012). 1 - Principles on membrane and membrane processes. In C. Charcosset (Ed.), *Membrane Processes in Biotechnology and Pharmaceutics*, (pp. 1-41). Amsterdam: Elsevier.
176. Charcosset, C. (2012). 2 - Ultrafiltration. In C. Charcosset (Ed.), *Membrane Processes in Biotechnology and Pharmaceutics*, (pp. 43-99). Amsterdam: Elsevier.
177. Vandanjon, L., Johannsson, R., Derouiniot, M., Bourseau, P., & Jaouen, P. (2007). Concentration and purification of blue whiting peptide hydrolysates by membrane processes. *Journal of Food Engineering*, 83(4), 581-589.
178. Giorno, L., & Drioli, E. (2000). Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. *Trends in biotechnology*, 18(8), 339-349.
179. Sablani, S., Goosen, M., Al-Belushi, R., & Wilf, M. (2001). Concentration polarization in ultrafiltration and reverse osmosis: a critical review. *Desalination*, 141(3), 269-289.
180. Saxena, A., Tripathi, B. P., Kumar, M., & Shahi, V. K. (2009). Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: an overview. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145(1-2), 1-22.
181. Fernández, A., Zhu, Y., FitzGerald, R. J., & Riera, F. A. (2014). Membrane fractionation of a  $\beta$ -lactoglobulin tryptic digest: effect of the membrane characteristics. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(4), 508-515.
182. Wan, Y., Lu, J., & Cui, Z. (2006). Separation of lysozyme from chicken egg white using ultrafiltration. *Separation and Purification technology*, 48(2), 133-142.
183. Datta, D., Bhattacharjee, S., Nath, A., Das, R., Bhattacharjee, C., & Datta, S. (2009). Separation of ovalbumin from chicken egg white using two-stage ultrafiltration technique. *Separation and Purification technology*, 66(2), 353-361.
184. Allen, G. (2011). Chapter 4. Sequencing of proteins and peptides. In T. S. Work & R. H. Burdon (Eds.), *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, vol. 9 (pp. 73-133): Elsevier.
185. Wu, S., Qi, W., Li, T., Lu, D., Su, R., & He, Z. (2013). Simultaneous production of multi-functional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. *Food Chemistry*, 141(3), 2944-2951.
186. Chiang, W.-D., Tsou, M.-J., Tsai, Z.-Y., & Tsai, T.-C. (2006). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor. *Food Chemistry*, 98(4), 725-732.
187. Prazeres, D., & Cabral, J. (1994). Enzymatic membrane bioreactors and their applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(9), 738-750.
188. Chiang, W.-D., Tsou, M.-J., Weng, C.-h., & Tsai, T.-C. (2008). Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from egg white protein hydrolysates using a membrane reactor. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16(2).
189. Jakovetić Tanasković, S., Luković, N., Grbavčić, S., Stefanović, A., Jovanović, J., Bugarski, B., & Knežević-Jugović, Z. (2018). Production of egg white protein hydrolysates with improved antioxidant capacity in a continuous enzymatic membrane reactor: optimization of operating parameters by statistical design. *Journal of Food Science and Technology*, 55(1), 128-137.
190. Guadix, A., Camacho, F., & Guadix, E. M. (2006). Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor. *Journal of Food Engineering*, 72(4), 398-405.

191. Chiang, W.-D., Cordle, C. T., & Thomas, R. L. (1995). Casein hydrolysate produced using a formed-in-place membrane reactor. *Journal of Food Science*, 60(6), 1349-1352.
192. Tiwari, B. K., & Mason, T. J. (2012). Chapter 6 - Ultrasound Processing of Fluid Foods. In *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*, (pp. 135-165). San Diego: Academic Press.
193. Li, H., Pordesimo, L., & Weiss, J. (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, 37(7), 731-738.
194. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
195. Shaw, D. J. (1992). 7 - Charged interfaces. In *Introduction to Colloid and Surface Chemistry (Fourth Edition)*, (pp. 174-209). Oxford: Butterworth-Heinemann.
196. 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.
197. 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.
198. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
199. Haider, S. R., Reid, H. J., & Sharp, B. L. (2012). Tricine-SDS-PAGE. In B. Kurien, Scofield R. (Ed.), *Protein Electrophoresis. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol. 869 (pp. 81-91): Humana Press, Totowa, NJ.
200. Schägger, H., & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368-379.
201. Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1, 16-22.
202. Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181, 1199.
203. Gorjanović, S. Ž., Novaković, M. M., Potkonjak, N. I., & Sužnjević, D. Ž. (2010). Antioxidant Activity of Wines Determined by a Polarographic Assay Based on Hydrogen Peroxide Scavenge. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4626-4631.
204. Oyaizu, M. (1986). Studies on Products of Browning Reaction: Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315.
205. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.
206. Chung, S.-K., Osawa, T., & Kawakishi, S. (1997). Hydroxyl Radical-scavenging Effects of Spices and Scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(1), 118-123.
207. Alashi, A. M., Blanchard, C. L., Mailer, R. J., Agboola, S. O., Mawson, A. J., He, R., Girgih, A., & Aluko, R. E. (2014). Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 146, 500-506.
208. Decker, E. A., & Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 674-677.

209. Memarpour-Yazdi, M., Asoodeh, A., & Chamani, J. (2012). A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 278-286.
210. Chandrasekara, A., & Shahidi, F. (2011). Inhibitory Activities of Soluble and Bound Millet Seed Phenolics on Free Radicals and Reactive Oxygen Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 428-436.
211. Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014 (Article ID 360438), 31 pages.
212. Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., & Lema, J. M. (2000). Evaluation of Extracts from *Gevuina avellana* Hulls as Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3890-3897.
213. Al-Saikhan, M. S., Howard, L. R., & Miller, J. C. (1995). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Different Genotypes of Potato (*Solanum tuberosum*, L.). *Journal of Food Science*, 60(2), 341-343.
214. Okić Đorđević, I., Kukolj, T., Krstić, J., Trivanović, D., Obradović, H., Santibañez, J. F., Mojsilović, S., Ilić, V., Bugarski, D., & Jauković, A. (2016). The inhibition of periodontal ligament stem cells osteogenic differentiation by IL-17 is mediated via MAPKs. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 71, 92-101.
215. Aničić, N. V., Dimitrijević, S., Ristić, M. S., Petrović, S. S., & Petrović, S. D. (2005). Antimicrobial activity of essential oil of *Melissa officinalis* L., *Lamiaceae*. *Hemijaska industrija*, 59(9-10), 243-247.
216. Chang, B.-W., Chen, R. L. C., Huang, I. J., & Chang, H.-C. (2001). Assays for Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity. *Analytical Biochemistry*, 291(1), 84-88.
217. Qu, W., Ma, H., Zhao, W., & Pan, Z. (2013). ACE-inhibitory peptides production from defatted wheat germ protein by continuous coupling of enzymatic hydrolysis and membrane separation: Modeling and experimental studies. *Chemical Engineering Journal*, 226(0), 139-145.
218. Jiang, Z.-H., Wang, J.-R., Li, M., Liu, Z.-Q., Chau, K.-Y., Zhao, C., & Liu, L. (2005). Hemiterpene Glucosides with Anti-Platelet Aggregation Activities from *Ilex pubescens*. *Journal of Natural Products*, 68(3), 397-399.
219. Ribeiro, J. M., Schneider, M., & Guimarães, J. A. (1995). Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochemical Journal*, 308(1), 243-249.
220. Veličković, D. (2011). *Proučavanje transglukozilacionih reakcija katalizovanih maltažom iz Saccharomyces cerevisiae*. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Beograd.
221. Van der Plancken, I., Van Remoortere, M., Indrawati, Van Loey, A., & Hendrickx, M. E. (2003). Heat-Induced Changes in the Susceptibility of Egg White Proteins to Enzymatic Hydrolysis: a Kinetic Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(13), 3819-3823.
222. Knezevic-Jugovic, 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.
223. Handa, A., Takahashi, K., Kuroda, N., & Froning, G. W. (1998). Heat-induced Egg White Gels as Affected by pH. *Journal of Food Science*, 63(3), 403-407.

224. Su, Z., Li, X. & Jin, L. (2006). Comparison between enzymatic hydrolysis of egg white proteins with ultrasound and without ultrasound. *Food Science and Technology (in Chinese with English abstract)*, 31(12), 74-76.
225. 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.
226. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
227. Jiang, S., Ding, J., Andrade, J., Rababah, T. M., Almajwal, A., Abulmeaty, M. M., & Feng, H. (2017). Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 835-842.
228. Pazinato, C., Malta, L. G., Pastore, G. M., & Maria Netto, F. (2013). Antioxidant capacity of amaranth products: effects of thermal and enzymatic treatments. *Food Science and Technology*, 33, 485-493.
229. Sbroggio, M. F., Montilha, M. S., Figueiredo, V. R. G., Georgetti, S. R., & Kurozawa, L. E. (2016). Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Science and Technology*, 36(2), 375-381.
230. Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., & Nokihara, K. (1998). Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 49-53.
231. 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.
232. Elmalimadi, M. B., Jovanović, J. R., Stefanović, A. B., Tanasković, S. J., Djurović, S. B., Bugarski, B. M., & Knežević-Jugović, Z. D. (2017). Controlled enzymatic hydrolysis for improved exploitation of the antioxidant potential of wheat gluten. *Industrial Crops and Products*, 109, 548-557.
233. Li, X., Deng, J., Shen, S., Li, T., Yuan, M., Yang, R., & Ding, C. (2015). Antioxidant activities and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from defatted *Camellia oleifera* seed cake. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5681-5690.
234. Nyo, M. K., & Nguyen, L. T. (2017). Value-Addition of Defatted Peanut Cake by Proteolysis: Effects of Proteases and Degree of Hydrolysis on Functional Properties and Antioxidant Capacity of Peptides. *Waste and Biomass Valorization*, 1-9.
235. Charoen, R., Tipkanon, S., & Savedboworn, W. (2017). Production of rice bran protein hydrolysates from traditional Thai rice bran (Plai-Ngahm-Prachinburi). *International Food Research Journal*, 24(6), 2304-2311.
236. Ktari, N., Fakhfakh, N., Balti, R., Ben Khaled, H., Nasri, M., & Bougatef, A. (2013). Effect of Degree of Hydrolysis and Protease Type on the Antioxidant Activity of Protein Hydrolysates From Cuttlefish (*Sepia officinalis*) By-Products. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 22(5), 436-448.
237. Hamzeh, A., Rezaei, M., Khodabandeh, S., Motamedzadegan, A., & Noruzinia, M. (2017). Antiproliferative and antioxidative activities of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) protein hydrolysates as affected by degree of hydrolysis. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-7.
238. 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.

239. Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Chen, J., Sun, Y., Su, Y., Li, H., Cui, W., & 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.
240. 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.
241. Gea, S.-J., Bai, H., Yuan, H.-S., & Zhang, L.-X. (1996). Continuous production of high degree casein hydrolysates by immobilized proteases in column reactor. *Journal of Biotechnology*, *50*(2), 161-170.
242. Dryáková, A., Pihlanto, A., Marnila, P., Čurda, L., & Korhonen, H. T. (2010). Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *European Food Research and Technology*, *230*(6), 865-874.
243. Karamać, M., Kosińska-Cagnazzo, A., & Kulczyk, A. (2016). Use of Different Proteases to Obtain Flaxseed Protein Hydrolysates with Antioxidant Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(7), 1027.
244. Meinschmidt, P., Sussmann, D., Schweiggert-Weisz, U., & Eisner, P. (2016). Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties. *Food Science & Nutrition*, *4*(1), 11-23.
245. Zheng, L., Zhao, Y., Xiao, C., Sun-Waterhouse, D., Zhao, M., & Su, G. (2015). Mechanism of the discrepancy in the enzymatic hydrolysis efficiency between defatted peanut flour and peanut protein isolate by Flavorzyme. *Food Chemistry*, *168*, 100-106.
246. 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.
247. 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. Presented at the Well Characterized Biotechnology Pharmaceuticals Meeting in San Francisco, 6-8 January 1997.1. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *16*(4), 593-603.
248. 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.
249. Rebeca, B. D., PeÑA-Vera, M. T., & DÍAz-CastaÑEda, M. (1991). Production of Fish Protein Hydrolysates with Bacterial Proteases; Yield and Nutritional Value. *Journal of Food Science*, *56*(2), 309-314.
250. Zhang, S., Zhang, C., Qiao, Y., Xing, L., Kang, D., Khan, I. A., Huang, M., & Zhou, G. (2017). Effect of Flavourzyme on proteolysis, antioxidant activity and sensory qualities of Cantonese bacon. *Food Chemistry*, *237*, 779-785.
251. Feng, L., Qiao, Y., Zou, Y., Huang, M., Kang, Z., & Zhou, G. (2014). Effect of Flavourzyme on proteolysis, antioxidant capacity and sensory attributes of Chinese sausage. *Meat Science*, *98*(1), 34-40.
252. Kato, Y., Watanabe, K., & Sato, Y. (1978). Effect of the Maillard Reaction on the Attributes of Egg White Proteins. *Agricultural and Biological Chemistry*, *42*(12), 2233-2237.
253. Reilly, J. M. (1982). Role of the Maillard, or "Protein-Sugar" Reaction in Highlight Yellowing of Albumen Photographic Prints. *AIC Preprints*, 160-168.

254. Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41(6), 1296-1302.
255. Pan, M., Jiang, T., & Pan, J. (2011). Antioxidant Activities of Rapeseed Protein Hydrolysates. *Food and Bioprocess Technology*, 4(7), 1144-1152.
256. Duh, P. D. (1998). Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* linné): Its scavenging effect on free-radical and active oxygen. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(4), 455-461.
257. Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., & Qian, M. (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1619-1624.
258. Nadaroğlu, H., Demir, Y., & Demir, N. (2007). Antioxidant and radical scavenging properties of *Iris germanica*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 41(8), 409-415.
259. Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., & Liu, J. (2008). Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*, 106(2), 444-450.
260. Li, X. X., Han, L. J., & Chen, L. J. (2008). In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(9), 1660-1666.
261. Le Maux, S., Nongonierma, A. B., Barre, C., & FitzGerald, R. J. (2016). Enzymatic generation of whey protein hydrolysates under pH-controlled and non pH-controlled conditions: Impact on physicochemical and bioactive properties. *Food Chemistry*, 199, 246-251.
262. Oneda, H., Muta, Y., & Inouye, K. (2004). Substrate-dependent Activation of Thermolysin by Salt. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(8), 1811-1813.
263. Cheison, S. C., Leeb, E., Toro-Sierra, J., & Kulozik, U. (2011). Influence of hydrolysis temperature and pH on the selective hydrolysis of whey proteins by trypsin and potential recovery of native alpha-lactalbumin. *International Dairy Journal*, 21(3), 166-171.
264. Jin, J., Ma, H., Qu, W., Wang, K., Zhou, C., He, R., Luo, L., & Owusu, J. (2015). Effects of multi-frequency power ultrasound on the enzymolysis of corn gluten meal: Kinetics and thermodynamics study. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 46-53.
265. Kılıç Apar, D., & Özbek, B. (2007). Hydrolysis and solubilization of corn gluten by Neutrase. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82(12), 1107-1114.
266. Wang, B., Atungulu, G. G., Khir, R., Geng, J., Ma, H., Li, Y., & Wu, B. (2014). Ultrasonic Treatment Effect on Enzymolysis Kinetics and Activities of ACE-Inhibitory Peptides from Oat-Isolated Protein. *Food Biophysics*, 10(3), 244-252.
267. Novikov, V. Y., Derkach, S. R., Kuchina, Y. A., Shironina, A. Y., & Mukhin, V. A. (2018). Kinetics of enzymatic reactions in the production of fish protein hydrolysates. *Journal of Dispersion Science and Technology*, Article in Press, 1-8.
268. Qu, W., Ma, H., Jia, J., He, R., Luo, L., & Pan, Z. (2012). Enzymolysis kinetics and activities of ACE inhibitory peptides from wheat germ protein prepared with SFP ultrasound-assisted processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(5), 1021-1026.
269. 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.
270. Li, S., Ma, H., Guo, Y., Oladejo, A. O., Yang, X., Liang, Q., & Duan, Y. (2018). A new kinetic model of ultrasound-assisted pretreatment on rice protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 40, 644-650.



271. Chen, X., Luo, Y., Qi, B., Luo, J., & Wan, Y. (2017). Improving the hydrolysis efficiency of soy sauce residue using ultrasonic probe-assisted enzymolysis technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, *35*, 351-358.
272. 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.
273. Margot, A., Flaschel, E., & Renken, A. (1997). Empirical kinetic models for tryptic whey-protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, *32*(3), 217-223.
274. Ghadge, R. S., Sawant, S. B., & Joshi, J. B. (2003). Enzyme deactivation in a bubble column, a stirred vessel and an inclined plane. *Chemical Engineering Science*, *58*(23), 5125-5134.
275. Mohamed Ahmed, I. A., Morishima, I., Babiker, E. E., & Mori, N. (2009). Dubiumin, a chymotrypsin-like serine protease from the seeds of *Solanum dubium* Fresen. *Phytochemistry*, *70*(4), 483-491.
276. Zou, Y., Ding, Y., Feng, W., Wang, W., Li, Q., Chen, Y., Wu, H., Wang, X., Yang, L., & Wu, X. (2016). Enzymolysis kinetics, thermodynamics and model of porcine cerebral protein with single-frequency countercurrent and pulsed ultrasound-assisted processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, *28*, 294-301.
277. Ma, H., Huang, L., Jia, J., He, R., Luo, L., & Zhu, W. (2011). Effect of energy-gathered ultrasound on Alcalase. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(1), 419-424.
278. Wu, Q., Zhang, X., Jia, J., Kuang, C., & Yang, H. (2018). Effect of ultrasonic pretreatment on whey protein hydrolysis by alcalase: Thermodynamic parameters, physicochemical properties and bioactivities. *Process Biochemistry*, *Article in Press*.
279. Rooney, J. J. (1995). Eyring transition-state theory and kinetics in catalysis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, *96*(1), L1-L3.
280. Pace, C. N., Shirley, B. A., McNutt, M., & Gajiwala, K. (1996). Forces contributing to the conformational stability of proteins. *The FASEB Journal*, *10*(1), 75-83.
281. Compiani, M., & Capriotti, E. (2013). Computational and Theoretical Methods for Protein Folding. *Biochemistry*, *52*(48), 8601-8624.
282. Rose, G. D., Fleming, P. J., Banavar, J. R., & Maritan, A. (2006). A backbone-based theory of protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(45), 16623-16633.
283. Cheng, Y., Liu, Y., Wu, J., Ofori Donkor, P., Li, T., & Ma, H. (2017). Improving the enzymolysis efficiency of potato protein by simultaneous dual-frequency energy-gathered ultrasound pretreatment: Thermodynamics and kinetics. *Ultrasonics Sonochemistry*, *37*, 351-359.
284. Mawson, R., Gamage, M., Terefe, N. S., & Knoerzer, K. (2011). Ultrasound in Enzyme Activation and Inactivation. In H. Feng, G. Barbosa-Canovas & J. Weiss (Eds.), *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*, (pp. 369-404). New York, NY: Springer New York.
285. 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.
286. 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.
287. Huang, H., Kwok, K.-C., & Liang, H.-H. (2008). Inhibitory activity and conformation changes of soybean trypsin inhibitors induced by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, *15*(5), 724-730.

288. Messens, W., Van Camp, J., & Huyghebaert, A. (1997). The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 8(4), 107-112.
289. Chanamai, R., & McClements, D. J. (2002). Comparison of Gum Arabic, Modified Starch, and Whey Protein Isolate as Emulsifiers: Influence of pH, CaCl<sub>2</sub> and Temperature. *Journal of Food Science*, 67(1), 120-125.
290. 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(0), 13-18.
291. 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.
292. Haskard, C. A., & Li-Chan, E. C. Y. (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.
293. 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.
294. 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.
295. Zhou, Y., & Zhuang, X. (2007). Kinetic Analysis of Sequential Multi-step Reactions. *The journal of physical chemistry. B*, 111(48), 13600-13610.
296. Shaevitz, J. W., Abbondanzieri, E. A., Landick, R., & Block, S. M. (2003). Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution. *Nature*, 426, 684.
297. Lu, H. P., Xun, L., & Xie, X. S. (1998). Single-Molecule Enzymatic Dynamics. *Science*, 282(5395), 1877-1882.
298. Zhou, Y., & Zhuang, X. (2006). Robust Reconstruction of the Rate Constant Distribution Using the Phase Function Method. *Biophysical Journal*, 91(11), 4045-4053.
299. Chen, H. (2017). *Protein digestion kinetics in pigs and poultry*. Doctoral Dissertation. Wageningen University & Research, Wageningen, Netherlands.
300. Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V., & Peričin, D. (2010). Hydrolysis of pumpkin oil cake protein isolate and free radical scavenging activity of hydrolysates: Influence of temperature, enzyme/substrate ratio and time. *Food and Bioprocess Processing*, 88(2), 277-282.
301. de Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2015). A response surface approach on optimization of hydrolysis parameters for the production of egg white protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(1), 55-62.
302. Tsou, M.-J., Kao, F.-J., Tseng, C.-K., & Chiang, W.-D. (2010). Enhancing the anti-adipogenic activity of soy protein by limited hydrolysis with Flavourzyme and ultrafiltration. *Food Chemistry*, 122(1), 243-248.
303. Sun, S., Ma, M., Lin, Q., & Yang, T. (2013). Systematic Investigation of Antioxidant Activity of Egg White Protein Hydrolysates Obtained by Pepsin. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 5(01), 57-62.

304. Wiriayaphan, C., Chitsomboon, B., & Yongsawadigul, J. (2012). Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. *Food Chemistry*, *132*(1), 104-111.
305. Cian, R. E., Vioque, J., & Drago, S. R. (2015). Structure–mechanism relationship of antioxidant and ACE I inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate fractionated by pH. *Food Research International*, *69*, 216-223.
306. Rossini, K., Noreña, C. P. Z., Cladera-Olivera, F., & Brandelli, A. (2009). Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically deboned poultry meat. *LWT - Food Science and Technology*, *42*(4), 862-867.
307. Centenaro, G. S., Salas-Mellado, M., Pires, C., Batista, I., Nunes, M. L., & Prentice, C. (2014). Fractionation of Protein Hydrolysates of Fish and Chicken Using Membrane Ultrafiltration: Investigation of Antioxidant Activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *172*(6), 2877-2893.
308. 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.
309. Pokora, M., Zambrowicz, A., Dąbrowska, A., Eckert, E., Setner, B., Szoltysik, M., Szewczuk, Z., Zablocka, A., Polanowski, A., Trziszka, T., & Chrzanowska, J. (2014). An attractive way of egg white protein by-product use for producing of novel anti-hypertensive peptides. *Food Chemistry*, *151*(0), 500-505.
310. Lin, S., Guo, Y., You, Q., Yin, Y., & Liu, J. (2012). Preparation of antioxidant peptide from egg white protein and improvement of its activities assisted by high-intensity pulsed electric field. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *92*(7), 1554-1561.
311. Liu, J., Jin, Y., Lin, S., Jones, G. S., & Chen, F. (2015). Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, *175*, 258-266.
312. Pihlanto, A., & Korhonen, H. (2003). Bioactive peptides and proteins. In *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 47 (pp. 175-276): Academic Press.
313. Pihlanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, *16*(11), 1306-1314.
314. Arcan, I., & Yemenicioğlu, A. (2010). Effects of controlled pepsin hydrolysis on antioxidant potential and fractional changes of chickpea proteins. *Food Research International*, *43*(1), 140-147.
315. Lee, S.-J., Kim, E.-K., Hwang, J.-W., Oh, H.-J., Cheong, S.-H., Moon, S.-H., Jeon, B.-T., Lee, S. M., & Park, P.-J. (2010). Purification and characterisation of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysates of duck processing by-products. *Food Chemistry*, *123*(2), 216-220.
316. Opitz, S. E. W., Smrke, S., Goodman, B. A., & Yeretjian, C. (2014). Chapter 26 - Methodology for the Measurement of Antioxidant Capacity of Coffee: A Validated Platform Composed of Three Complementary Antioxidant Assays A2 - Preedy, Victor. In *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, (pp. 253-264). San Diego: Academic Press.
317. Lin, S., Jin, Y., Liu, M., Yang, Y., Zhang, M., Guo, Y., Jones, G., Liu, J., & Yin, Y. (2013). Research on the preparation of antioxidant peptides derived from egg white with assisting of high-intensity pulsed electric field. *Food Chemistry*, *139*(1), 300-306.
318. Cerretani, L., & Bendini, A. (2010). Chapter 67 - Rapid Assays to Evaluate the Antioxidant Capacity of Phenols in Virgin Olive Oil A2 - Preedy, Victor R. In R. R.

- Watson (Ed.), *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, (pp. 625-635). San Diego: Academic Press.
319. Zepp, R. G., Faust, B. C., & Hoigne, J. (1992). Hydroxyl radical formation in aqueous reactions (pH 3-8) of iron(II) with hydrogen peroxide: the photo-Fenton reaction. *Environmental Science & Technology*, 26(2), 313-319.
  320. Cheeseman, K. H., Beavis, A., & Esterbauer, H. (1988). Hydroxyl-radical-induced iron-catalysed degradation of 2-deoxyribose. Quantitative determination of malondialdehyde. *Biochemical Journal*, 252(3), 649-653.
  321. Lee, J., Koo, N., & Min, D. B. (2004). Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 21-33.
  322. Tanzadehpanah, H., Asoodeh, A., & Chamani, J. (2012). An antioxidant peptide derived from Ostrich (*Struthio camelus*) egg white protein hydrolysates. *Food Research International*, 49(1), 105-111.
  323. Arise, A. K., Alashi, A. M., Nwachukwu, I. D., Ijabadeniyi, O. A., Aluko, R. E., & Amonsou, E. O. (2016). Antioxidant activities of bambara groundnut (*Vigna subterranea*) protein hydrolysates and their membrane ultrafiltration fractions. *Food & Function*, 7(5), 2431-2437.
  324. Homayouni-Tabrizi, M., Asoodeh, A., Abbaszadegan, M.-R., Shahrokhbabadi, K., & Nakhaie Moghaddam, M. (2015). An identified antioxidant peptide obtained from ostrich (*Struthio camelus*) egg white protein hydrolysate shows wound healing properties. *Pharmaceutical Biology*, 53(8), 1155-1162.
  325. Hayyan, M., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2016). Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical Reviews*, 116(5), 3029-3085.
  326. Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430-441.
  327. Masuda, T., Isobe, J., Jitoe, A., & Nakatani, N. (1992). Antioxidative curcuminoids from rhizomes of *Curcuma xanthorrhiza*. *Phytochemistry*, 31(10), 3645-3647.
  328. Girotti, A. W. (1985). Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1(2), 87-95.
  329. Repetto, M., Semprine, J., & Boveris, A. (2012). Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. In A. Catala (Ed.), *Lipid peroxidation*, (pp. 3-31): InTechOpen.
  330. Ranathunga, S., Rajapakse, N., & Kim, S.-K. (2006). Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). *European Food Research and Technology*, 222(3), 310-315.
  331. Zhang, H. J., Wang, J., Zhang, B. H., & Zhang, H. (2014). Antioxidant activities of the fractionated protein hydrolysates from heat stable defatted rice bran. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(5), 1330-1336.
  332. Chen, G., Zhao, L., Zhao, L., Cong, T., & Bao, S. (2007). *In vitro* study on antioxidant activities of peanut protein hydrolysate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(2), 357-362.
  333. Terpinč, P., Bezjak, M., & Abramovič, H. (2009). A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chemistry*, 115(2), 740-744.
  334. Park, E. Y., Imazu, H., Matsumura, Y., Nakamura, Y., & Sato, K. (2012). Effects of Peptide Fractions with Different Isoelectric Points from Wheat Gluten Hydrolysates on Lipid Oxidation in Pork Meat Patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(30), 7483-7488.

335. Alamed, J., Chaiyasit, W., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2009). Relationships between Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2969-2976.
336. Khantaphant, S., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2011). Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and commercial proteases. *Process Biochemistry*, 46(1), 318-327.
337. Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Kristinsson, H. G., & Kishimura, H. (2015). Antioxidant and sensory properties of protein hydrolysate derived from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by one- and two-step hydrolysis. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3336-3349.
338. Xie, Z., Huang, J., Xu, X., & Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111(2), 370-376.
339. Zhang, Q., Tong, X., Sui, X., Wang, Z., Qi, B., Li, Y., & Jiang, L. (2018). Antioxidant activity and protective effects of Alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Food Research International*, Article in Press.
340. Chalamaiah, M., Tummala, J., Diwan, P. D., Venu Babu, V., Sharma, P., & Dinesh Kumar, B. (2016). Nutritional composition, ACE-inhibitory, and metal chelating properties of rohu (*Labeo rohita*) egg protein hydrolysate produced by Alcalase. *International Food Research Journal*, 23(3), 1017-1026.
341. Pokora, M., Eckert, E., Zambrowicz, A., Bobak, Ł., Szoltysik, M., Dąbrowska, A., Chrzanowska, J., Polanowski, A., & Trziszka, T. (2013). Biological and functional properties of proteolytic enzyme-modified egg protein by-products. *Food Science & Nutrition*, 1(2), 184-195.
342. Pownall, T. L., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2010). Amino Acid Composition and Antioxidant Properties of Pea Seed (*Pisum sativum* L.) Enzymatic Protein Hydrolysate Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4712-4718.
343. Oliveira, C., Coletto, D., Corrêa, A., Daroit, D. J., Toniolo, R., Cladera-Olivera, F., & Brandelli, A. (2014). Antioxidant activity and inhibition of meat lipid oxidation by soy protein hydrolysates obtained with a microbial protease. *International Food Research Journal*, 21(2), 775-781.
344. He, R., Girgih, A. T., Malomo, S. A., Ju, X., & Aluko, R. E. (2013). Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 219-227.
345. Tang, C.-H., Wang, X.-S., & Yang, X.-Q. (2009). Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, 114(4), 1484-1490.
346. Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. (2008). Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 1973-1977.
347. Chang, C.-Y., Wu, K.-C., & Chiang, S.-H. (2007). Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry*, 100(4), 1537-1543.
348. You, S.-J., Udenigwe, C. C., Aluko, R. E., & Wu, J. (2010). Multifunctional peptides from egg white lysozyme. *Food Research International*, 43(3), 848-855.
349. Memarpoor-Yazdi, M., Asoodeh, A., & Chamani, J. (2012). Structure and ACE-Inhibitory Activity of Peptides Derived from Hen Egg White Lysozyme. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 18(4), 353-360.

350. Rao, S.-Q., Ju, T., Sun, J., Su, Y.-J., Xu, R.-R., & Yang, Y.-J. (2012). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysate of hen egg white lysozyme. *Food Research International*, 46(1), 127-134.
351. Asoodeh, A., Memarpour Yazdi, M., & Chamani, J. (2012). Purification and characterisation of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from lysozyme hydrolysates. *Food Chemistry*, 131(1), 291-295.
352. Tanzadehpanah, H., Asoodeh, A., Saberi, M. R., & Chamani, J. (2013). Identification of a novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide from ostrich egg white and studying its interactions with the enzyme. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 18, 212-219.
353. Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Wang, F., Yu, Y., Liu, B., Liu, J., & Chen, F. (2011). Characterization of ACE-Inhibitory Peptide Associated with Antioxidant and Anticoagulation Properties. *Journal of Food Science*, 76(8), C1149-C1155.
354. Yi, H. J., Kim, J. Y., Kim, K. H., & Lee, H. J. (2003). Anticancer activity of peptide fractions from egg white hydrolysate against mouse lymphoma cells. *Food Science and Biotechnology*, 12(3), 224-227.
355. Baron, F., Nau, F., Guérin-Dubiard, C., Bonnassie, S., Gautier, M., Andrews, S. C., & Jan, S. (2016). Egg white versus *Salmonella Enteritidis*! A harsh medium meets a resilient pathogen. *Food Microbiology*, 53, 82-93.
356. Watanabe, K., Tsuge, Y., & Shimoyamada, M. (1998). Binding Activities of Pronase-Treated Fragments from Egg White Ovomucin with Anti-ovomucin Antibodies and Newcastle Disease Virus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11), 4501-4506.
357. Moon, S. H., Lee, J. H., Lee, Y. J., Chang, K. H., Paik, J. Y., Ahn, D. U., & Paik, H. D. (2013). Screening for cytotoxic activity of ovotransferrin and its enzyme hydrolysates. *Poultry Science*, 92(2), 424-434.
358. 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.
359. Oguro, T., Watanabe, K., Tani, H., Ohishi, H., & Ebina, T. (2000). Morphological Observations on Antitumor Activities of 70 kDa Fragment in  $\alpha$ -Subunit from Pronase-Treated Ovomucin in a Double Grafted Tumor System. *Food Science and Technology Research*, 6(3), 179-185.
360. Omana, D. A., Wang, J., & Wu, J. (2010). Ovomucin – a glycoprotein with promising potential. *Trends in Food Science & Technology*, 21(9), 455-463.
361. Shcherbakova, E. G., Bukhman, V. M., Isakova, E. B., Bodiagin, D. A., Arkhipova, N. A., Rastunova, G. A., Vorob'eva, L. S., & Lipatov, N. N. (2002). Effect of lysozyme on the growth of murine lymphoma and antineoplastic activity of cyclophosphamide. *Antibiotiki i khimioterapiia = Antibiotics and chemotherapy [sic]*, 47(11), 3-8.
362. Sava, G. (1989). Reduction of B16 melanoma metastases by oral administration of egg-white lysozyme. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 25(3), 221-222.
363. Blishchenko, E. Y., Sazonova, O. V., Kalinina, O. A., Moiseeva, E. V., Vass, A. A., Karelin, A. A., & Ivanov, V. T. (2005). Antitumor effect of valorphin in vitro and in vivo: combined action with cytostatic drugs. *Cancer biology & therapy*, 4(1), 125-131.
364. Kannan, A., Hettiarachchy, N., Johnson, M. G., & Nannapaneni, R. (2008). Human colon and liver cancer cell proliferation inhibition by peptide hydrolysates derived

- from heat-stabilized defatted rice bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 11643-11647.
365. Sheih, I.-C., Fang, T. J., Wu, T.-K., & Lin, P.-H. (2009). Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 1202-1207.
366. Thomas, A. S., Saravanakumar, R., & Gupta, P. V. (2017). Evaluation of cytotoxic activity of protein extracts from the leaves of *Morinda pubescens* on human cancer cell lines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(1), 99-104.
367. Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M.-T., & Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual review of nutrition*, 21(1), 381-406.
368. Fleischauer, A. T., Simonsen, N., & Arab, L. (2003). Antioxidant supplements and risk of breast cancer recurrence and breast cancer-related mortality among postmenopausal women. *Nutrition and cancer*, 46(1), 15-22.
369. Kanadaswami, C., Lee, L.-T., Lee, P.-P. H., Hwang, J.-J., Ke, F.-C., Huang, Y.-T., & Lee, M.-T. (2005). The antitumor activities of flavonoids. *In vivo*, 19(5), 895-909.
370. Xiao, B., Guo, J., Liu, D., & Zhang, S. (2007). Aloe-emodin induces in vitro G2/M arrest and alkaline phosphatase activation in human oral cancer KB cells. *Oral oncology*, 43(9), 905-910.
371. Lee, Y. G., Lee, K. W., Kim, J. Y., Kim, K. H., & Lee, H. J. (2004). Induction of apoptosis in a human lymphoma cell line by hydrophobic peptide fraction separated from anchovy sauce. *Biofactors*, 21(1-4), 63-67.
372. Tzianabos, A. O. (2000). Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 523-533.
373. Pellegrini, A. (2003). Antimicrobial Peptides from Food Proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 9(1), 1225-1238.
374. Wong, J. H., & Ng, T. B. (2005). Lunatusin, a trypsin-stable antimicrobial peptide from lima beans (*Phaseolus lunatus* L.). *Peptides*, 26(11), 2086-2092.
375. Ibrahim, H. R., Sugimoto, Y., & Aoki, T. (2000). Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1523(2), 196-205.
376. Thammasirirak, S., Pukcothanung, Y., Preecharram, S., Daduang, S., Patramanon, R., Fukamizo, T., & Araki, T. (2010). Antimicrobial peptides derived from goose egg white lysozyme. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151(1), 84-91.
377. Biziulevičius, G. A., Kislukhina, O. V., Kazlauskaitė, J., & Žukaitė, V. (2006). Food-protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: a 'cause and effect' theory of bifunctionality. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 46(1), 131-138.
378. Shai, Y. (2002). From innate immunity to de-novo designed antimicrobial peptides. *Current Pharmaceutical Design*, 8(9), 715-725.
379. Taha, F. S., Mohamed, S. S., Wagdy, S. M., & Mohamed, G. F. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of enzymatic hydrolysis products from sunflower protein isolate. *World Applied Sciences Journal*, 21(5), 651-658.
380. Abdel-Shafi, S., Osman, A., Enan, G., El-Nemer, M., & Sitohy, M. (2016). Antibacterial activity of methylated egg white proteins against pathogenic G<sup>+</sup> and G<sup>-</sup> bacteria matching antibiotics. *SpringerPlus*, 5(1), 983.
381. Uluko, H., Liu, L., Li, H., Cui, W., Zhang, S., Zhao, L., Xue, H., & Lv, J. (2014). Effect of power ultrasound pretreatment on peptidic profiles and angiotensin

- converting enzyme inhibition of milk protein concentrate hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2420-2428.
382. Huang, L., Liu, B., Ma, H., & Zhang, X. (2014). Combined effect of ultrasound and enzymatic treatments on production of ACE inhibitory peptides from wheat germ protein. *Journal of food processing and preservation*, 38(4), 1632-1640.
  383. Uluko, H., Li, H., Cui, W., Zhang, S., Liu, L., Chen, J., Sun, Y., Su, Y., & Lv, J. (2013). Response surface optimization of angiotensin converting enzyme inhibition of milk protein concentrate hydrolysates in vitro after ultrasound pretreatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 133-139.
  384. Cheung, H.-S., Wang, F.-l., Ondetti, M. A., Sabo, E. F., & Cushman, D. W. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 255(2), 401-407.
  385. Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y., & Takano, T. (1996). A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *The American journal of clinical nutrition*, 64(5), 767-771.
  386. Motoi, H., & Kodama, T. (2003). Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from wheat gliadin hydrolysate. *Molecular Nutrition & Food Research*, 47(5), 354-358.
  387. Fahmi, A., Morimura, S., Guo, H.-C., Shigematsu, T., Kida, K., & Uemura, Y. (2004). Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochemistry*, 39(10), 1195-1200.
  388. Gu, R.-Z., Li, C.-Y., Liu, W.-Y., Yi, W.-X., & Cai, M.-Y. (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of low-molecular-weight peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) skin. *Food Research International*, 44(5), 1536-1540.
  389. Balti, R., Nedjar-Arroume, N., Bougatef, A., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Three novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) using digestive proteases. *Food Research International*, 43(4), 1136-1143.
  390. Gu, R.-Z., Liu, W.-Y., Lin, F., Jin, Z.-T., Chen, L., Yi, W.-X., Lu, J., & Cai, M.-Y. (2012). Antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of oligopeptides derived from black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) muscle. *Food Research International*, 49(1), 326-333.
  391. Yamada, Y., Matoba, N., Usui, H., Onishi, K., & Yoshikawa, M. (2002). Design of a highly potent anti-hypertensive peptide based on ovokinin (2-7). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(6), 1213-1217.
  392. Fujita, H., Sasaki, R., & Yoshikawa, M. (1995). Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidylcholine. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(12), 2344-2345.
  393. 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.
  394. You, S. J., & Wu, J. (2011). Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activities of Egg Protein Hydrolysates Produced with Gastrointestinal and Nongastrointestinal Enzymes. *Journal of Food Science*, 76(6), C801-C807.
  395. Khullar, M., Relan, V., & Sherawat, B. S. (2004). Letter: Antioxidant Activities and Oxidative Stress Byproducts in Human Hypertension. *Hypertension*, 43(2), e7-e8.



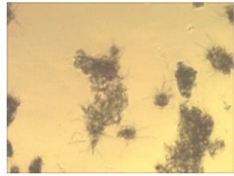
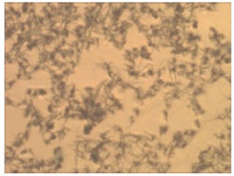
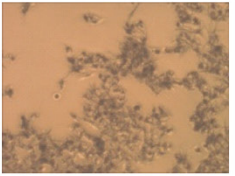
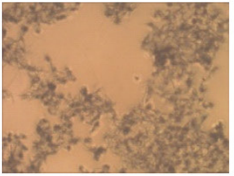
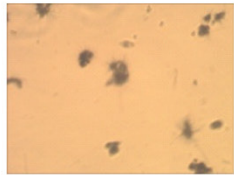
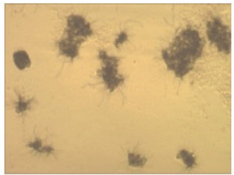
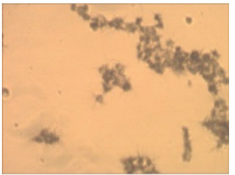
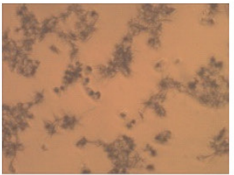
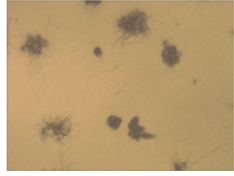
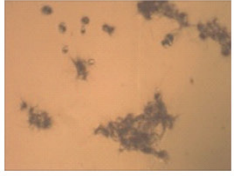
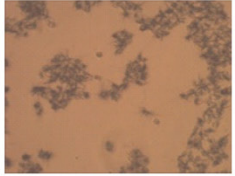
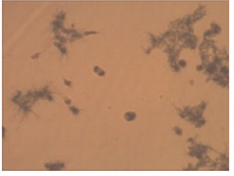
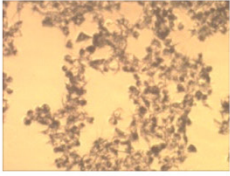
396. Yang, W. G., Wang, Z., & Xu, S. Y. (2007). A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. *Chinese Chemical Letters*, 18(4), 449-451.
397. Đorđević, D. (2010). Koagulacija krvi. In D. Raković, Uskoković, D. (Ed.), *Biomaterijali*, (pp. 167-179). Beograd: Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti (ITN-SANU), Društvo za istraživanje materijala.
398. Liu, J. B., Wang, F., Wang, C., Liu, J., Wang, Z. Z., Wang, E. L., Zhang, Y., & Lin, S. (2012). Optimization of preparation for anticoagulant peptide from egg white powder by Alcalase. *Jilin Daxue Xuebao (Gongxueban)/Journal of Jilin University (Engineering and Technology Edition)*, 42(1), 250-255.
399. Cho, H.-J., Kittaka, R., Abdou, A. M., Kim, M., Kim, H.-S., Lee, D.-H., & Park, H.-J. (2009). Inhibitory effects of oligopeptides from hen egg white on both human platelet aggregation and blood coagulation. *Archives of Pharmacal Research*, 32(6), 945-953.
400. Yu, Z., Liu, B., Zhao, W., Yin, Y., Liu, J., & Chen, F. (2012). Primary and secondary structure of novel ACE-inhibitory peptides from egg white protein. *Food Chemistry*, 133(2), 315-322.
401. Pallarès, I., Vendrell, J., Avilés, F. X., & Ventura, S. (2004). Amyloid fibril formation by a partially structured intermediate state of  $\alpha$ -chymotrypsin. *Journal of molecular biology*, 342(1), 321-331.
402. Yin, S. W., Tang, C. H., Wen, Q. B., & Yang, X. Q. (2010). Functional and conformational properties of phaseolin (*Phaseolus vulgris* L.) and kidney bean protein isolate: A comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(4), 599-607.
403. Charoenphun, N., Youravong, W., & Cheirsilp, B. (2013). Determination of reaction kinetics of hydrolysis of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein for manipulating production of bioactive peptides with antioxidant activity, angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and Ca-binding properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(2), 419-428.
404. Berends, P., Appel, D., Eisele, T., Rabe, S., & Fischer, L. (2014). Performance of enzymatic wheat gluten hydrolysis in batch and continuous processes using Flavourzyme. *LWT-Food Science and Technology*, 58(2), 534-540.
405. Jakovetić, S., Luković, N., Jugović, B., Gvozdenović, M., Grbavčić, S., Jovanović, J., & Knežević-Jugović, Z. (2015). Production of Antioxidant Egg White Hydrolysates in a Continuous Stirred Tank Enzyme Reactor Coupled with Membrane Separation Unit. *Food and Bioprocess Technology*, 8(2), 287-300.
406. Bermúdez-Aguirre, D., Mobbs, T., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2011). Ultrasound applications in food processing. In *Ultrasound technologies for food and bioprocessing*, (pp. 65-105): Springer.
407. Mokrane, H., Belhocine, D., & Mameri, N. (2006). Comparison and efficiency of two membranes (modified MF and UF) during enzymatic hydrolysis of haemoglobin in a membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science*, 281(1), 170-176.
408. Prieto, C. A., Guadix, A., González-Tello, P., & Guadix, E. M. (2007). A cyclic batch membrane reactor for the hydrolysis of whey protein. *Journal of Food Engineering*, 78(1), 257-265.
409. Prieto, C. A., Guadix, E. M., & Guadix, A. (2010). Optimal operation of a protein hydrolysis reactor with enzyme recycle. *Journal of Food Engineering*, 97(1), 24-30.

410. Prieto, C. A., Guadix, E. M., & Guadix, A. (2008). Influence of temperature on protein hydrolysis in a cyclic batch enzyme membrane reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 42(3), 217-223.

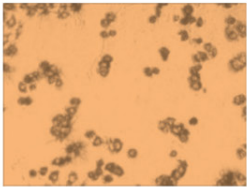
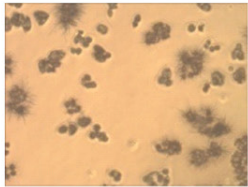
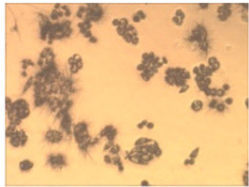
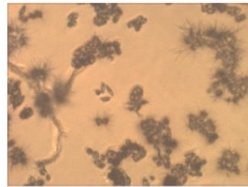
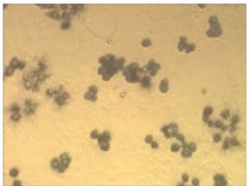
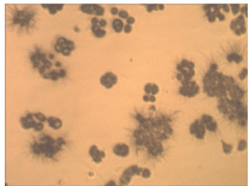
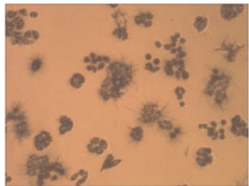
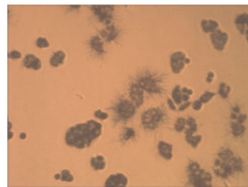
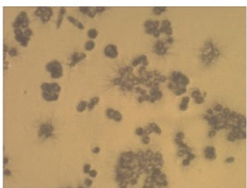
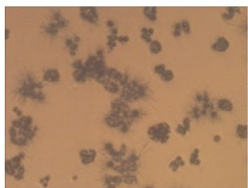
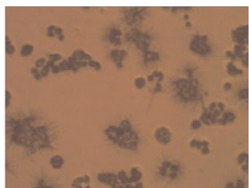
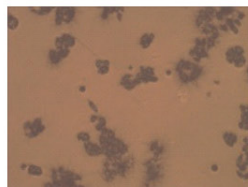
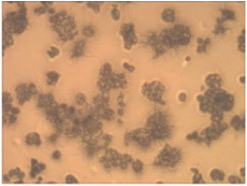
*ПРИЛОЗИ*

---

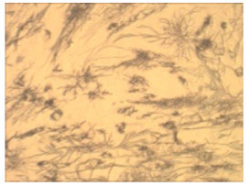
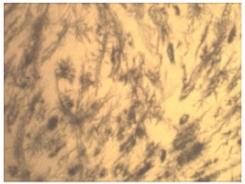
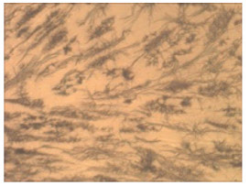
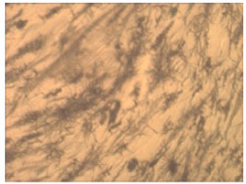
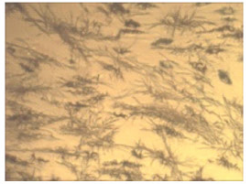
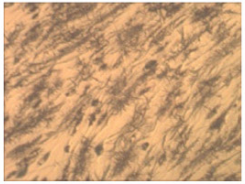
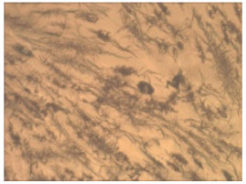
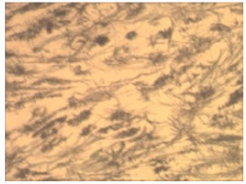
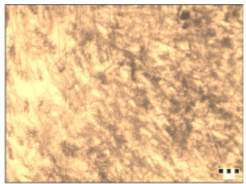
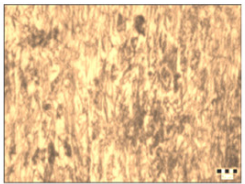
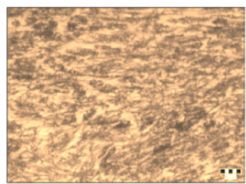
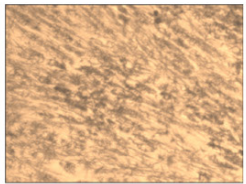
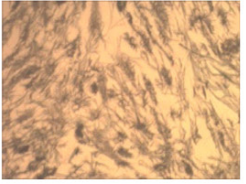
**ПРИЛОГ 1**  
**АНТИПРОЛИФЕРАТИВНА АКТИВНОСТ ПЕПТИДА БЕЛАНЦЕТА**

Концентрација пептида, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	$35,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$	$317,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$	$3,50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$	$1,75 \mu\text{g}/\text{cm}^3$
Нативно нетретирано беланце (негативна контрола)				
Хидролизат ултразвучно претретираних протеина				
Хидролизат протеина претретиран високом температуром				
Медијум за култивацију (DMEM-позитивна контрола)				

Слика П-1.1. Морфолошке промене на хуманим ћелијским културама аденокарцинома дојке током 72 сата под дејством протеинских хидролизата претретираних ултразвуком фреквенце  $40 \pm 2 \text{ kHz}$  и/или термички.

Концентрација пептида, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	$35,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$	$317,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$	$3,50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$	$1,75 \mu\text{g}/\text{cm}^3$
Нативно нетретирано беланце (негативна контрола)				
Хидролизат ултразвучно претретираних протеина				
Хидролизат протеина претретиран високом температуром				
Медијум за култивацију (DMEM-позитивна контрола)				

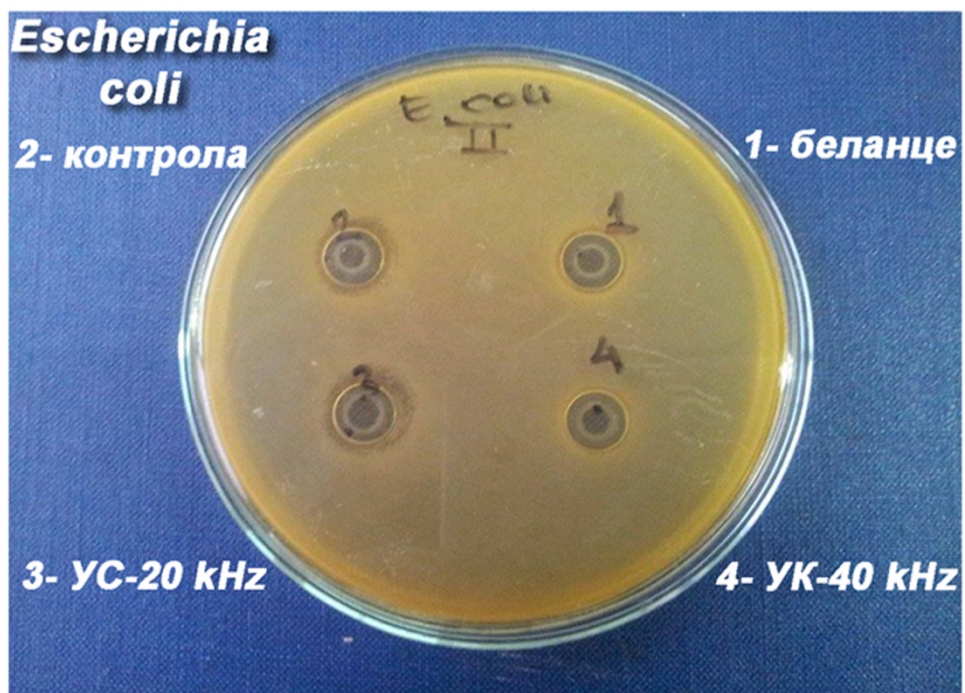
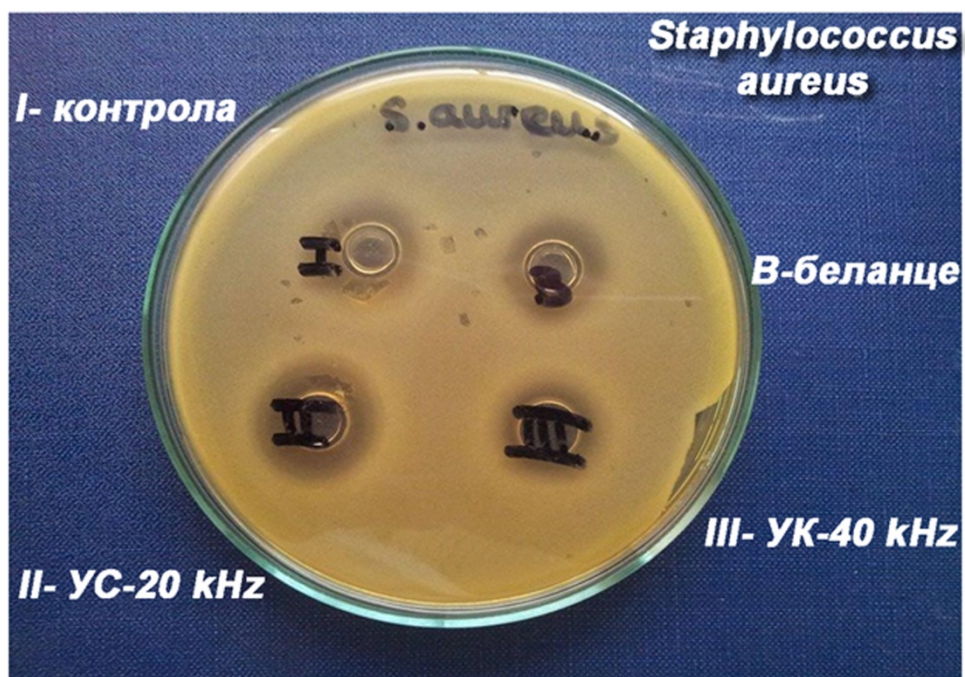
Слика П-1.2. Морфолошке промене на хуманим ћелијским културама колоректалног карцинома током 72 сата под дејством протеинских хидролизата претретираних ултразвуком фреквенце  $40 \pm 2 \text{ kHz}$  и/или термички.

Концентрација пептида, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	$35,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$	$317,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$	$3,50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$	$1,75 \mu\text{g}/\text{cm}^3$
Нативно нетретирано беланце (негативна контрола)				
Хидролизат ултразвучно претретираних протеина				
Хидролизат протеина претретиран високом температуром				
Медијум за култивацију (DMEM-позитивна контрола)				

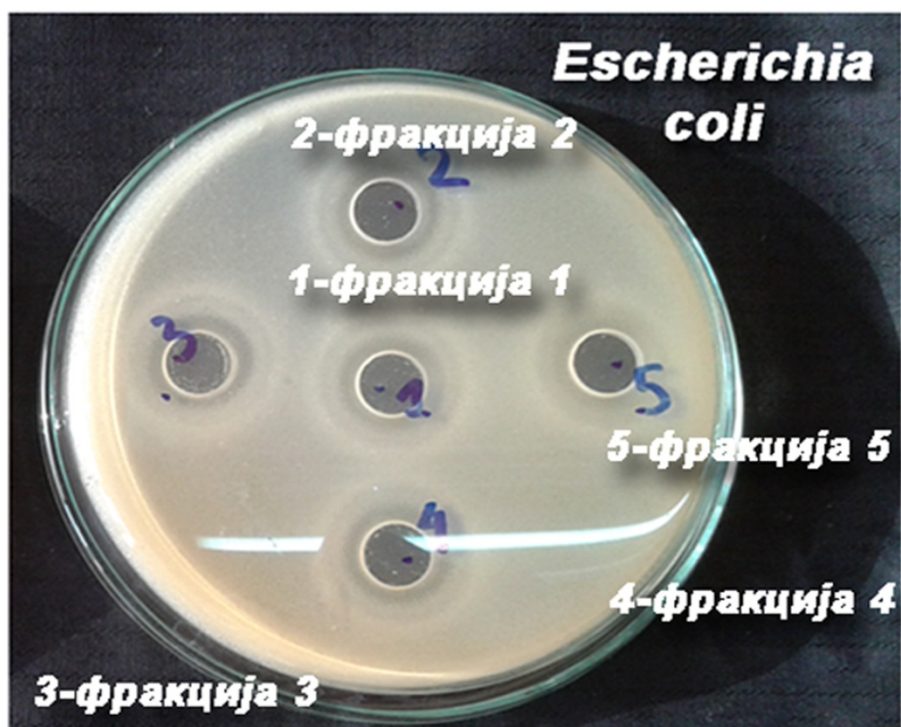
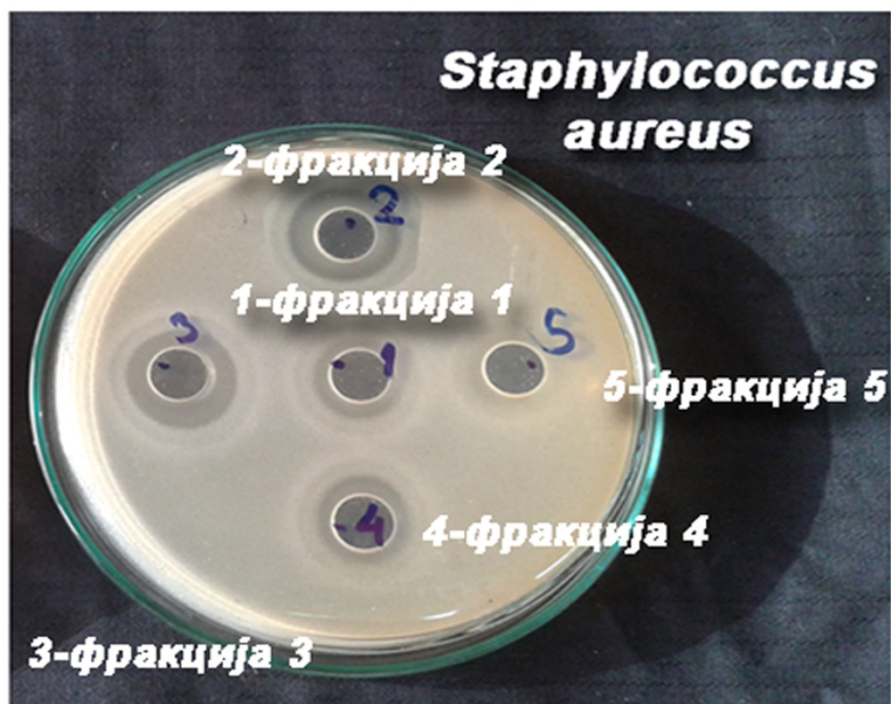
Слика П-1.3. Морфолошке промене на мезенхималних матичних ћелија изоловане из перидонталног лигамента током 72 сата под дејством протеинских хидролизата претретираних ултразвуком фреквенце  $40 \pm 2 \text{ kHz}$  и/или термички.

## ПРИЛОГ 2

### АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ ПЕПТИДА БЕЛАНЦЕТА



**Слика П-2.1.** Антимикробна активност хидролизата протеина беланцета са аспекта пречника зоне инхибиције. *Легенда:* УК-40 kHz – ултразвучно купатило фреквенце  $40 \pm 2$  kHz; УС-20 kHz – ултразвучна сонда фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz; контрола – без претретмана.

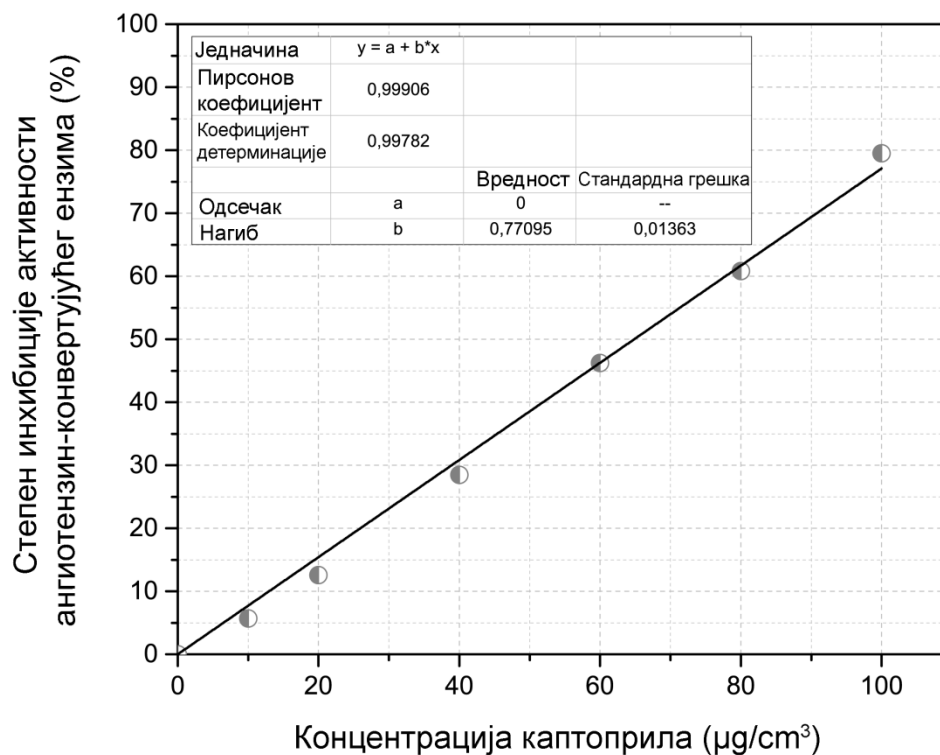


**Слика П-2.2.** Антимикробна активност фракција пептида изолованих из хидролизата протеина беланцета са аспекта пречника зоне инхибиције. *Легенда:* УК-40 kHz – ултразвучно купатило фреквенце  $40 \pm 2$  kHz; УС-20 kHz – ултразвучна сонда фреквенце  $20 \pm 0,2$  kHz; контрола – без претретмана.



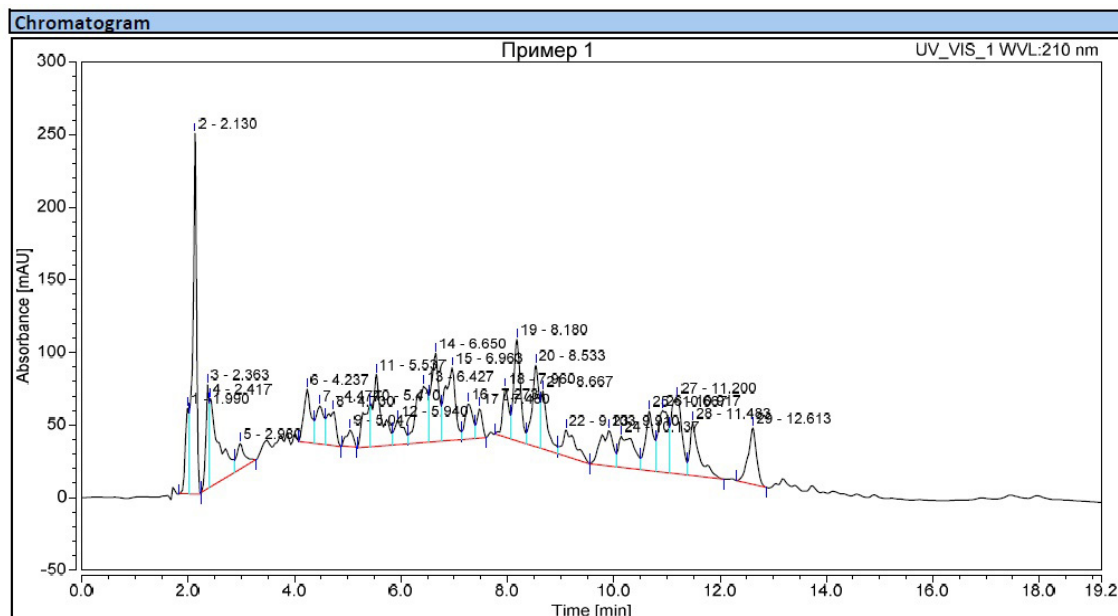
### ПРИЛОГ 3

#### ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИХИПЕРТЕНЗИТИВНЕ АКТИВНОСТИ



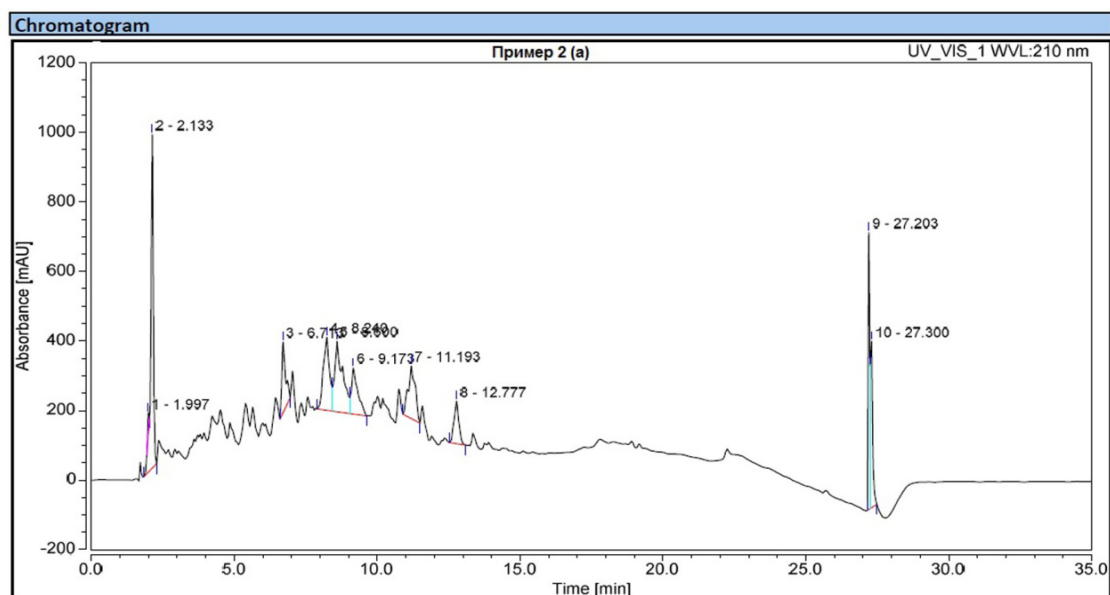
Слика П-3.1. Утицај концентрације каптоприла на степен инхибиције активности ангиотензин-конвертујућег ензима.

**ПРИЛОГ 4**  
**ХРОМАТОГРАМИ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ ПОД ВИСКИМ**  
**ПРИТИСКОМ**

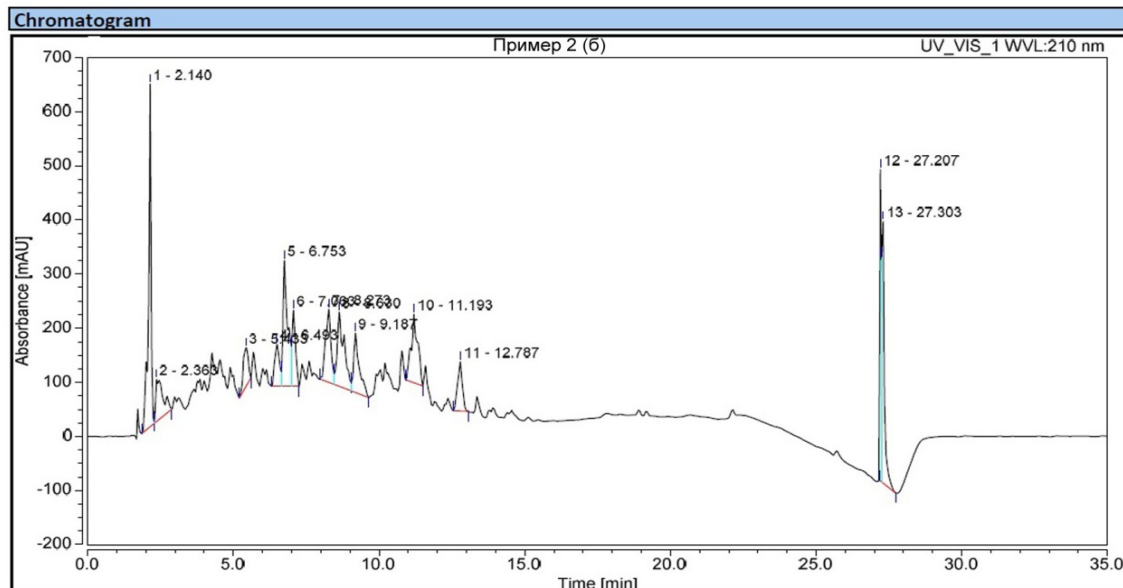


Слика П-4.1. Хроматограм добијен применом реверзно-фазне течне хроматографије под високим притиском (RP-HPLC) за хидролизат протеина беланцета претретираних високом температуром (75 °C-30 min).

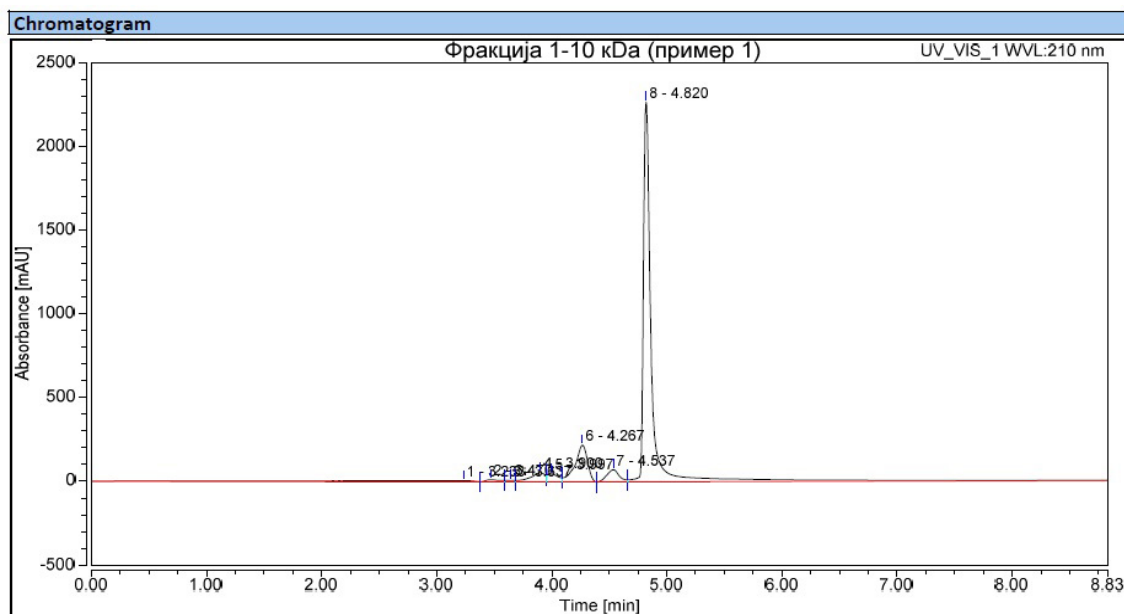
a)



б)

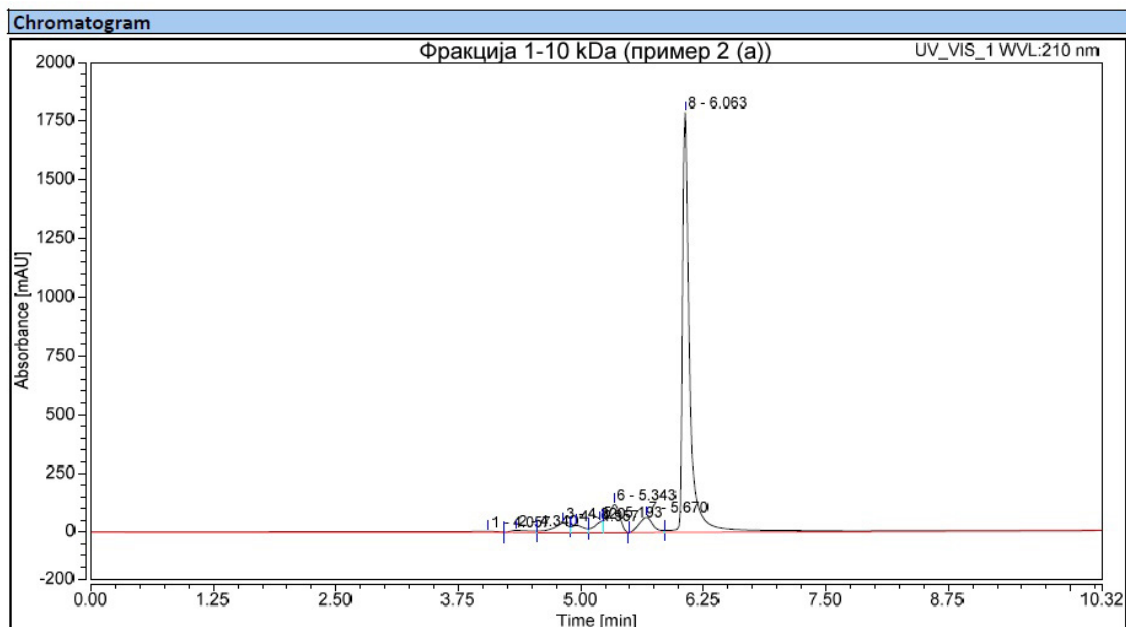


Слика П-4.2. Хроматограм добијен применом реверзно-фазне течне хроматографије под високим притиском (RP-HPLC) за хидролизате протеина беланцета претретираних ултразвучним таласима фреквенце  $40 \pm 2$  kHz - 15 min (а) и 35 kHz - 30 min (б).

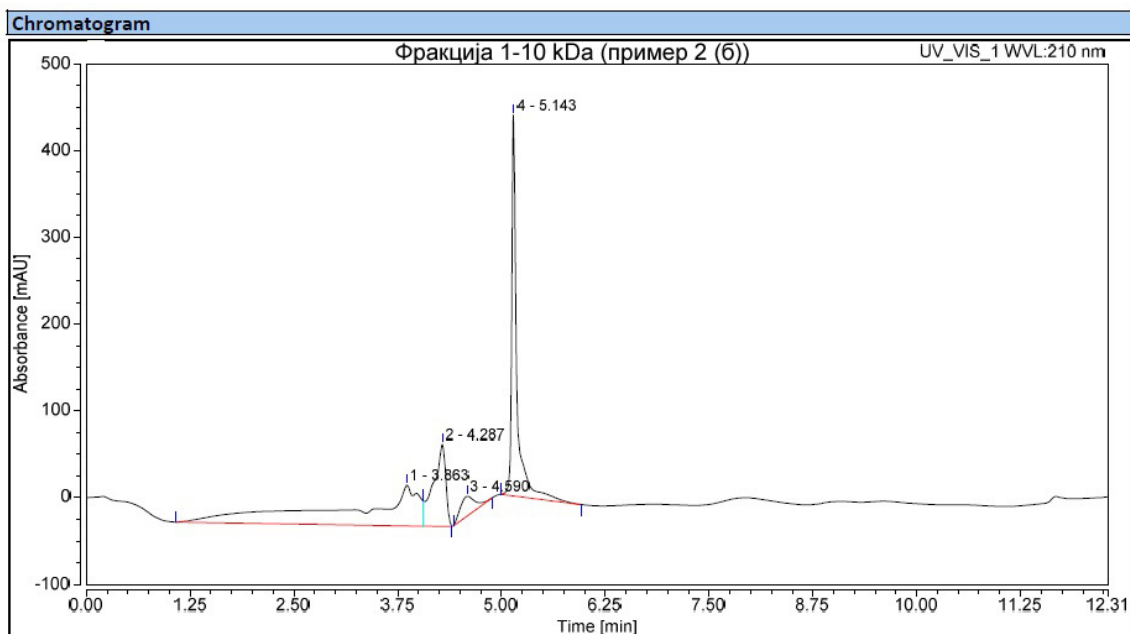


Слика П-4.3. Хроматограм добијен применом реверзно-фазне течне хроматографије под високим притиском (RP-HPLC) за фракцију пептида молекуларне масе мање од 10 kDa изоловану из хидролизата протеина беланцета претретираних високом температуром ( $75$  °C- 30 min).

a)



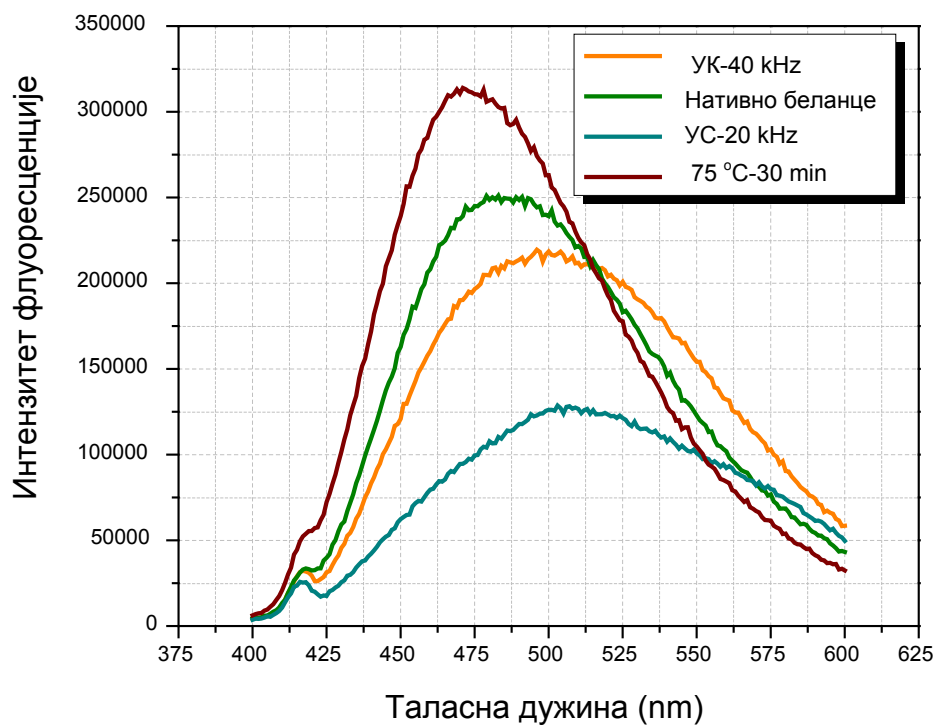
б)



**Слика П-4.4.** Хроматограм добијен применом реверзно-фазне течне хроматографије под високим притиском (RP-HPLC) за фракцију пептида молекуларне масе мање од 10 kDa изоловану из хидролизата протенина беланцета претретираних претретираних ултразвучним таласима фреквенце  $40 \pm 2$  kHz - 15 min (а) и 35 kHz - 30 min(б).

## ПРИЛОГ 5

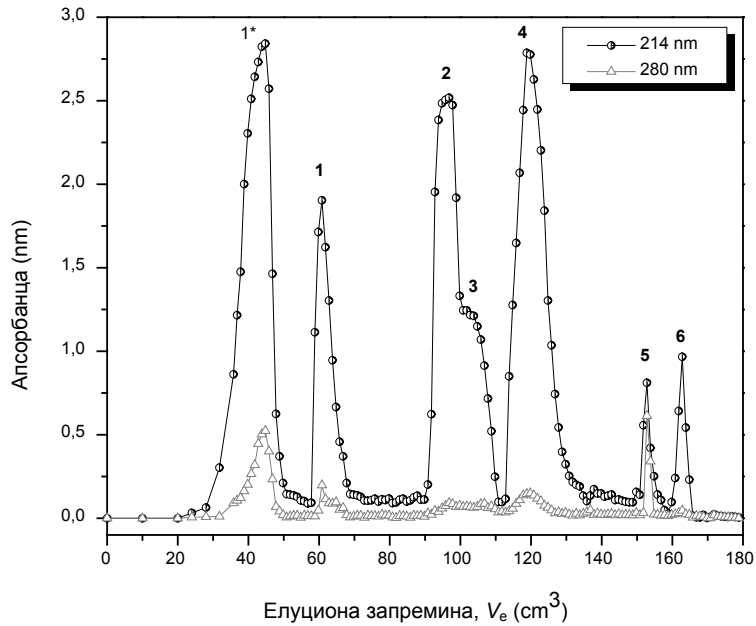
### ПОВРШИНСКА ХИДРОФОБНОСТ



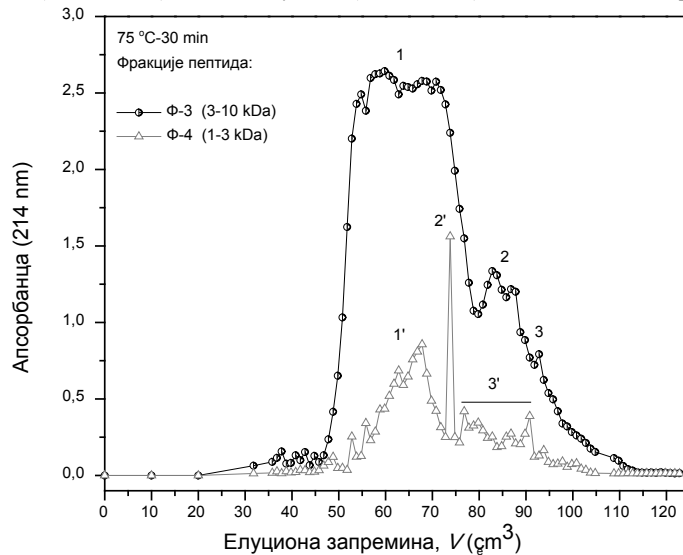
**Слика П-5.1.** Емисиони спектар флуоресценције нативног протеина беланцета и протеина претретираних ултразвучним талсама фреквенце  $20 \pm 0,2$  и  $40 \pm 2$  kHz и високом температуром.

## ПРИЛОГ 6

### ХРОМАТОГРАМИ ПРЕПАРАТИВНЕ ГЕЛ-ФИЛТРАЦИОНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ



**Слика П-6.1.** Хроматограм стандарда познатих молекулских маса раздвојених на гел-филтрационој колони са Toyoperal HW-40F пуњењем: 1–лизозим (14300 Da), 2–инсулин (5800 Da), 3–хипурил-L-хидтидин-L-леуцин (429,47 Da), 4–редуковани L-глутатион (307,32 Da), 5–фениланин (165,19 Da) и 6–L-леуцин (113,17 Da), 1\*–плави декстран (2000 kDa)



**Слика П-6.2.** Хроматограм ултрафилтарционих фракција пептида молекулске масе 3-10 kDa и 1-3 kDa изолованих из хидролизата протеина претретираних високом температуром, и раздвојених на гел-филтрационој колони са Toyoperal HW-40F пуњењем.

## ПРИЛОГ 7

### БИОГРАФИЈА

**Јелена Р. Јовановић** рођена је 4. децембра 1987. године у Смедереву, Република Србија, где је завршила основну школу и гимназију. Основне академске студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија, уписала је 2006. године. Завршни рад на тему „Производња протеаза из *Candida utilis* применом технике гајења на чврстим подлогама” одбранила је 24. септембра 2010. године са оценом 10 (десет). Мастер академске студије, на истом факултету, у оквиру студијског програма Биохемијско инжењерство и биотехнологија, профил Биохемијско инжењерство уписала је школске 2010/2011 године. Завршни мастер рад на тему „Ензимска синтеза етил-цинамата у реактору са флуидизованим слојем“ одбранила је 15. јула 2011. године са оценом 10 (десет) и просечном оценом током студирања 9,25 (девет и 25/100), чиме је стекла звање мастер инжењер технологије.

Школске 2011/2012. године уписала је докторске студије, на студијском програму Биохемијско инжењерство и биотехнологија Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду, под менторством проф. др Зорице Кнежевић-Југовић. Од марта 2012. до априла 2015. године ангажована је као стипендиста-докторант Министарства просвете, науке и технолошког развоја ангажована је на пројекту „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“ (ИИИ 46010). Положила је све испите предвиђене наставним планом и програмом докторских студија са просечном оценом 9,55 (девет и 55/100) укључујући и Завршни испит са оценом 10 (десет). Од 1. априла 2015. године запослена је на Технолошко-металуршком факултету, у оквиру пројекта наведеног пројекта ИИИ 46010. У звање истраживач сарадник први пут је изабрана је 8. јуна 2015. године, а 6. јула 2018. године усвојено је решење о реизбору у ово звање.

Коаутор је 12 (дванаест) радова у међународном часописима (два М21а, два М21, пет М22, три М23), три рада у часописима националног значаја (два М51 и један М52) и 25 (двадесетпет) саопштење на домаћим и међународним скуповина (осам М33, три М63, дванаест М34 и два М64), као и поглавља у монографији међународног значаја (М13) и 2 (две) патентне пријаве (једне М87 и једане М94).

## ПРИЛОГ 8

### Изјава о ауторству

Име и презиме аутора           **Јелена Јовановић**          

Број индекса           **4064/2011**          

#### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

#### **ПРОИЗВОДЊА БИОЛОШКИ АКТИВНИХ ПЕПТИДА ПРОТЕИНА БЕЛАНЦЕТА ЕНЗИМСКИМ ПОСТУПКОМ, ИЗОЛОВАЊЕ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, **3.9.2018.**





## ПРИЛОГ 9

### Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Јовановић

Број индекса 4064/2011

Студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада

#### ПРОИЗВОДЊА БИОЛОШКИ АКТИВНИХ ПЕПТИДА ПРОТЕИНА БЕЛАНЦЕТА ЕНЗИМСКИМ ПОСТУПКОМ, ИЗОЛОВАЊЕ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА

Ментор Проф. др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, **3.9.2018.**



## ПРИЛОГ 10

### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**ПРОИЗВОДЊА БИОЛОШКИ АКТИВНИХ ПЕПТИДА ПРОТЕИНА  
БЕЛАНЦЕТА ЕНЗИМСКИМ ПОСТУПКОМ, ИЗОЛОВАЊЕ И  
КАРАКТЕРИЗАЦИЈА**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, **3.9.2018.**

