

Univerzitet u Novom Sadu
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD

Prehrambeno inženjerstvo

Kandidat: master inž. tehnologije Sandra Bučko

**ADSORPCIONA I EMULGUJUĆA SVOJSTVA
PROTEINSKOG IZOLATA I HIDROLIZATA
SEMENA TIKVE (*CUCURBITA PEPO*)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: prof. dr Jaroslav Katona

Novi Sad, 2020

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

RB

Identifikacioni broj:

IB

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija

VR

Autor: Sandra Bučko, master inž.

AU

Mentor: dr Jaroslav Katona, vanredni profesor

MN

Naslov rada: Adsorpciona i emulgujuća svojstva proteinskog izolata i

NR hidrolizata semena tikve (*Cucurbita pepo*)

Jezik publikacije: Srpski, latinica

JP

Jezik izvoda: Srpski/Engleski

JI

Zemlja publikovanja: Republika Srbija

ZP

Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2020
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Srbija, Bul. cara Lazara 1
Fizički opis rada: FO	(poglavlja 6/ strana 140/ slika 45/ tabela 4/ reference 175)
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Koloidna hemija
Predmetna odrednica/ ključne reči: PO	Emulzije, prirodni emulgatori, biljni proteini, enzimska hidroliza, površinska aktivnost, reologija proteinskih adsorpcionih filmova
Čuva se: ČU	U biblioteci Tehnološkog fakulteta Novi Sad, Bul. cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
Važna napomena: VN	Nema
Izvod/abstract: IZ	Seme tikve (<i>Cucurbita pepo</i>) obiluje kako uljem tako i proteinima. Nakon izdvajanja ulja, proteini se koncentrišu u uljanoj pogači, sekundarnom proizvodu procesa proizvodnje ulja, gde njihov sadržaj dostiže do 65%. Proteini semena tikve su primamljiv sastojak za prehrambenu, farmaceutsku i kozmetičku industriju zbog

svoje farmakološke aktivnosti i visoke biološke vrednosti. Pored toga, budući da su mnogi proizvodi ovih industrija po svojoj koloidnoj prirodi emulzije, proteini semena tikve bi se u njima mogli naći i kao prirodne površinski aktivne materije. Međutim, koloidna funkcionalnost proteina semena tikve se još uvek potcenjuje zbog globularne strukture za koju se vezuju slabija funkcionalna svojstva u odnosu na proteine sa fleksibilnijom strukturom. Prema tome, cilj ove disertacije je ispitivanje funkcionalnih osobina proteinskog izolata semena tikve, pre svega njegovih adsorpcionih i emulgujućih svojstava, kao i ispitivanje uticaja promene proteinske strukture putem enzimske hidrolize na ispitivana svojstva.

Pripremljeni su izolat proteina semena tikve (IPST) i dva enzimska hidrolizata, H1 i H2. IPST, H1 i H2 su okarakterisani određivanjem sadržaja vlage, proteina i pepela, zatim, određivanjem prinosa, molekulske mase i zeta potencijala. Ispitan je uticaj koncentracije proteina/peptida ($0,0001-1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$), pH (3–8) i jonske jačine ($0-1 \text{ mol}/\text{dm}^3 \text{ NaCl}$) na rastvorljivost i adsorpciona svojstva: dinamički međupovršinski pritisak (ulje/voda), statički površinski (vazduh/voda) i međupovršinski (ulje/voda) pritisak, kinetiku adsorpcije i dilatacionu reologiju proteinskih adsorpcionih filmova. Nakon toga, ispitan je i uticaj pomenutih parametara na emulziona svojstva IPST, H1 i H2. Emulgujuća svojstva IPST, H1 i H2 su

okarakterisana na osnovu prosečnog prečnika kapljica emulzija, raspodele veličina kapljica i stabilnosti emulzija.

Utvrđeno je da je prinos IPST veći od prinosa oba hidrolizata za oko 65 %. IPST ima najnižu rastvorljivost na pH=5, što ujedno predstavlja i njegovu izoelektričnu tačku. Enzimskom hidrolizom IPST značajno se povećava rastvorljivost, posebno na pI=5. Povećanje jonske jačine je izazvalo *salting-in* ili *salting-out* efekat rastvorljivosti kod svih uzoraka u zavisnosti od pH. IPST, H1 i H2 poseduju površinsku aktivnost pri čemu je površinski/međupovršinski pritisak H1 i H2 manje zavistan od promene pH i jonske jačine u poređenju sa površinskim/međupovršinskim pritiskom IPST. Adsorpcijom na granicu faza IPST i oba hidrolizata obrazuju adsorpcione filmove sa dominantnom elastičnom komponentom. Emulgujuća svojstva IPST, H1 i H2 zavise od koncentracije uzorka, pH vrednosti i jonske jačine kontinualne faze. Pri koncentraciji od 1 g/100 cm³ i $I_c=0$ mol/dm³ pripremljene emulzije su stabilne na svim pH osim emulzije IPST na pH 5. Sve emulzije podležu gravitacionoj nestabilnosti.

Datum prihvatanja teme od 28.12.2017.

strane Senata:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije

(naučni stepen/ime i
prezime/zvanje/fakultet):

KO

dr Lidija Petrović, vanredni profesor, Tehnološki fakultet
Novi Sad, predsednik

dr Jaroslav Katona, vanredni profesor, Tehnološki
fakultet Novi Sad, mentor

Dr Ljiljana Popović, vanredni profesor, Tehnološki
fakultet Novi Sad, član

Dr Jadranka Fraj, docent, Tehnološki fakultet Novi Sad,
član

Dr Verica Đorđević, viši naučni saradnik, Tehnološko–
metalurški fakultet, član

University of Novi Sad

Faculty of Technology Novi Sad

KEYWORDS DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

Monographic publication

DT

Type of record:

Textual material, printed

TR

Contents code:

PhD thesis

CC

Author:

MSc Sandra Bučko

AU

Menthor:

PhD Jaroslav Katona, Associate Professor

MN

Title:

Adsorption and emulsifying properties of pumpkin

TI

(*Cucurbita pepo*) seed protein isolate and hydrolysate

Language of text:

Serbian, Latin

LT

Language of abstract:

Serbian/English

LA

Country of publication:

The Republic of Serbia

CP

Locality of publication: AP of Vojvodina

LP

Publication year: 2020

PY

Publisher: Author's reprint

PB

Publication place: 21000 Novi Sad, Srbija, Bul. cara Lazara 1

PL

Physical description: (Chapters 6/ Pages 140/ Figures 45/ Tables 4/ References 175)

PD

Scientific field: Technological Engineering

SF

Scientific discipline: Colloid Chemistry

SD

Predmetna odrednica/
ključne reči: Emulsion, Natural emulsifier, Plant protein, Enzymatic hydrolysis, Interfacial activity, Rheology of proteinaceous interfacial films

PO

Holding date: Library of the Faculty of Technology Novi Sad, Bul. cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija

HD

Note: /

N

Abstract: Pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed is rich source of both, oil and proteins. Once the oil has been extracted, proteins concentrate in oil cake, a by-product of the oil

AB

extraction process, where their content can reach up to 65%. Pumpkin seed proteins are desirable ingredient in food, pharmaceutical and cosmetic industry due to their pharmacological activities and high biological value. Moreover, since many of products of these industries are, in colloidal terms, emulsions, pumpkin seed proteins could serve as surface active materies. However, colloidal functionality of pumpkin seed proteins is still underestimated for their globular structure which entails inferior functional properties to functional properties of proteins with more flexible structure. Based on that, the aim of this dissertation is to investigate functional properties of pumpkin seed protein isolate, adsorption and emulsifying properties, in the first place, and then to investigate the influence of modification of the protein structure, by means of enzymatic hydrolysis, on the aforementioned properties.

Pumpkin seed protein isolate, IPST, and two enzymatic hydrolysates, H1 and H2, were prepared. IPST, H1 and H2 were characterized by determination of moisture, ash and protein content, then, by determination of protein recovery, molecular mass and zeta potential. Influence of the protein/peptide concentration (0.0001–1 g/100 cm³), pH (3–8) i ionic strength (0–1 mol/dm³ NaCl) on the solubility and adsorption properties: dynamic interfacial (oil/water) pressure, static surface (air/water) and interfacial (oil/water) pressure, adsorption kinetics and interfacial dilatational properties, was

investigated next. In the end, influence of the aforementioned parameters on the emulsifying properties of IPST, H1 and H2 was investigated. Emulsifying properties of IPST, H1 and H2 were discussed in terms of mean droplet diameter, droplet size distribution and emulsion stability.

Protein recovery of IPST was determined to be 65 % higher than recovery of H1 and H2. Solubility of IPST was the lowest at pH 5, what presents the isoelectric point. The enzymatic hydrolysis of IPST significantly increased solubility, especially at the isoelectric point. Increase in the ionic strength led to salting-in or salting-out effect depending on pH of the sample. Three investigated samples, IPST, H1 and H2 exhibited surface activity, however, surface/interfacial pressure of H1 and H2 were found to be less influenced by change in pH or ionic strength of the solution in comparison to the IPST. Once adsorbed to the interface IPST and both hydrolysates form interfacial film with dominant elastic component. Emulsifying properties of IPST, H1 and H2 depend on the concentration, pH and ionic strength of the continuous phase. Stable emulsions were formed at concentration of 1 g/100 cm³ and $I_c=0$ mol/dm³ regardless of pH, with the exception of the IPST at pH 5. All emulsions were susceptible to gravitational separation.

ASB

Defended on:

DE

Thesis Defend Board: (degree/name and surname/title/faculty)	PhD Lidija Petrović, Associate Professor, the Faculty of Technology Novi Sad, president
DB	PhD Jaroslav Katona, Associate Professor, the Faculty of Technology Novi Sad, mentor
	PhD Ljiljana Popović, Associate Professor, the Faculty of Technology Novi Sad, member
	PhD Jadranka Fraj, Assistant professor, the Faculty of Technology Novi Sad, member
	PhD Verica Đorđević, Senior Research Fellow, the Faculty of Technology and Metallurgy, member

Naučni radovi proistekli iz rada na doktorskoj disertaciji:

- I **Bučko, S. Đ.**, Katona, J. M., Petrović, L. B., Milinković, J. R., Fraj, J. L., Spasojević, Lj. M., Miller, R., (2018) Investigation on the influence of pH and ionic strength on adsorption and interfacial dilatational properties at an oil–water interface of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein hydrolysate. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 83 (7–8). pp. 847–861.
- II **Bučko, S.**, Katona, J., Petrović, L., Milinković, J., Spasojević, Lj., Mucić, N., Miller, R. (2018) The influence of Enzymatic Hydrolysis on Adsorption and Interfacial Dilatational Properties of Pumpkin (*Cucurbita pepo*) Seed protein isolate, *Food Biophysics*, 13 (3). pp. 217–225.
- III **Bučko, S.**, Katona, J., Popović, Lj., Vaštag, Ž. and Petrović, L. (2016) Functional properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate and hydrolysate. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 81 (1), pp. 35–46.
- IV **Bučko, S.**, Katona, J., Popović, Lj., Petrović, L. and Milinković, J. (2016) Influence of enzymatic hydrolysis on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 60, pp. 271–278.
- V **Bučko, S.**, Katona, J., Popović, Lj., Vaštag, Ž., Petrović, L. and Vučinić, M. (2015) Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *Lwt–food Science and Technology (Lebensmittel – Wissenschaft und Technologie)*, 64, pp. 609–615.

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Cilj disertacije	2
2. Teorijski deo sa pregledom literature	4
2.1. Adsorpcioni filmovi na granici faza tečno/tečno i tečno/gas.....	4
2.1.1. Adsorpcija koloida na granicu faza	4
2.1.2. Kinetika adsorpcije.....	7
2.1.3. Reološke osobine adsorpcionih filmova.....	11
2.1.4. Emulgujuće materije i stabilnost emulzija.....	16
2.2. Proteinski adsorpcioni filmovi	26
2.3. Proteini semena tikve (<i>Cucurbita Pepo</i>).....	31
2.3.1. Biljni proteini kao nosači koloidne funkcionalnosti.....	31
2.3.2. Izvori biljnih proteina	33
2.3.3. Molekularne osobine proteina semena tikve (<i>Cucurbita pepo</i>).....	34
2.3.4. Enzimaska hidroliza proteina	36
3. Materijal i metode.....	43
3.1. Materijal	43
3.2. Metode.....	45
3.2.1. Priprema izolata proteina semena tikve.....	45
3.2.2. Enzimaska hidroliza	45
3.2.3. Određivanje stepena hidrolize	46
3.2.4. Određivanje sadržaja vlage, pepela i proteina	47
3.2.5. Određivanje prinosa proteina.....	47
3.2.6. Natrijum–dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza (<i>SDS–PAGE</i>).....	48
3.2.7. Priprema Rastvora proteina	48
3.2.8. Određivanje rastvorljivosti IPST, H1 i H2	49
3.2.9. Merenje zeta potencijala	49
3.2.10. Određivanje površinskog i međupovršinskog napona/pritiska.....	50

3.2.11.	Određivanje dinamičkog međupovršinskog napona i reoloških osobina proteinskih adsorpcionih filmova	51
3.2.12.	Analiza kinetike adsorpcije.....	51
3.2.13.	Priprema i karakterizacija emulzija	52
3.2.14.	Stabilnost emulzija.....	54
4.	Rezultati i diskusija	55
4.1.	Sadržaj proteina, pepela i vlage	55
4.2.	Prinos proteina	56
4.3.	Molekulska masa Proteina	57
4.4.	Zeta potencijal proteina.....	58
4.5.	Rastvorljivost proteina	60
4.6.	Adsorpciona svojstva	64
4.6.1.	Površinski i međupovršinski pritisak.....	64
4.6.2.	Dinamički međupovršinski pritisak	68
4.6.3.	Kinetika adsorpcije	72
4.6.4.	Dilataciona reologija proteinskih adsorpcionih filmova	77
4.7.	Emulziona svojstva	83
5.	Zaključak	95
6.	Literatura	99

1. UVOD

Mnogi proizvodi prehrambene, farmaceutske i kozmetičke industrije su po svojoj koloidnoj prirodi emulzije, koje, sa stanovišta njihove upotrebe, treba da zadovolje niz zahteva po pitanju koloidne stabilnosti, disperznih osobina, teksturalnih svojstava i sl. U tom cilju, njima se dodaju različite supstance kao što su emulgatori, reološki modifikatori i stabilizatori koje mogu biti prirodnog, polusintetičkog ili sintetičkog porekla. Poslednjih godina postoji snažan trend, pre svega u prehrambenoj industriji, u korišćenju isključivo materija prirodnog porekla. U svojstvu prirodnih emulgatora prehrambenim proizvodima se često dodaju proteini, od kojih se najviše koriste natrijum–kazeinat i proteini surutke. Istovremeno, sve je veća težnja da se proteini životinjskog porekla, kao nosioci koloidne funkcionalnosti, zamene sa proteinima biljnog porekla. Ta težnja proizilazi iz nekoliko razloga: a) proizvodi koji sadrže sastojke isključivo biljnog porekla su prilagođeni i grupama potrošača sa restriktivnom ishranom (iz religijskih razloga, vegetarijancima, veganima itd.), b) za proizvodnju biljnih proteina troši se daleko manje energije u poređenju sa proizvodnjom proteina životinjskog porekla pri čemu se smanjuje pritisak na životnu sredinu, c) biljni proteini su jeftiniji i potiču iz lako dostupnih i obnovljivih izvora, d) zdravstvena bezbednost (učestale alergijske reakcije na proteine mleka, prioni, i sl.).

Poznato je da su uljarice bogat izvor proteina, gde sadržaj proteina u uljanoj pogači, nus proizvodu koji zaostaje nakon izdvajanja ulja iz semena, iznosi čak oko 60%. Ti proteini se, međutim, danas koriste skoro isključivo kao jeftin izvor aminokiselina u humanoj i pogotovo u animalnoj ishrani, dok je mogućnost njihove upotrebe kao nosioca koloidne funkcionalnosti u prehrambenim proizvodima nedovoljno ispitana i skoro potpuno neiskorišćena.

Jedna od uljarica sa visokim sadržajem proteina jeste i tikva (*Cucurbita pepo*), čije seme sadrži 31,5%–51% ulja i 24,5–36% proteina. Proteini koji nakon ceđenja ulja zaostaju u uljanoj pogači zauzimaju i do 65% njenog sadržaja. Glavnu proteinsku frakciju u semenu tikve čini 12S globulin – kukurbitin, koga prate 2S abumini koji zajedno čine 60% od ukupnih proteina semena tikve. Proteini semena tikve ispoljavaju biološku i farmakološku aktivnost, pri čemu je ustanovljeno da imaju antidijabetičko, antimikrobno, antiinflamatorno i antikancerogeno dejstvo, da inhibiraju mehanizme koagulacije krvi, kao i da ublažavaju negativne posledice pothranjenosti. Sa druge strane, studije o njihovim koloidnim osobinama su vrlo retke, naročito kada se radi o površinskoj aktivnosti, adsorpcionim i emulgujućim svojstvima. Uzrok ovakve situacije leži u slaboj rastvorljivosti biljnih proteina, posebno u kiseloj sredini, koja predstavlja jedan od osnovnih preduslova za ispoljavanje koloidne funkcionalnosti proteina.

Poboljšanje rastvorljivosti proteina može se postići modifikacijom strukture proteina, a jedan od najefikasnijih načina modifikacije predstavlja hidroliza proteina upotrebom enzima. Enzimskom hidrolizom proteina dobijaju se hidrolizati sa nižom molekulskom masom i delimično degradiranom tercijernom i sekundarnom strukturom, što obezbeđuje veću rastvorljivost hidrolizata i izmenjenu koloidnu funkcionalnost u odnosu na nativni protein. Pored toga, enzimska hidroliza poboljšava nutritivnu vrednost i bioaktivna svojstva nativnog proteina uz redukciju njegovog alergijskog potencijala.

1.1. CILJ DISERTACIJE

Osnovni cilj istraživanja je ispitivanje mogućnosti korišćenja proteina semena tikve (*Cucurbita pepo*) za formiranje adsorpcionih proteinskih filmova na površini dispergovanih kapi ulja kao i mogućnosti formiranja stabilnih emulzija. U tom cilju proteini semena tikve će se izolovati iz uljane pogače, kao nus proizvoda u procesu dobijanja hladno ceđenog ulja, čime će se dobiti izolat proteina semena tikve (IPST). Enzimskom hidrolizom izolata sa dva enzima, alkalazom i pepsinom, dobijaju se dva

hidrolizata proteina semena tikve, H1 i H2, respektivno, uz očekivano povećanje rastvorljivosti hidrolizata.

U cilju karakterizacije IPST, H1 i H2 određiće se molekulska masa dobijenih proteina/peptida, zatim, sadržaj vlage, pepela i proteina, i prinos procesa izolavanja. Odrediće se rastvorljivost i zeta potencijal IPST, H1 i H2 pri različitim uslovima sredine. Tenziometrijsko ispitivanje adsorpcije IPST, H1 i H2 na granici faza ulje/voda i vazduh/voda pri različitim uslovima sredine (pH, jonska jačina, koncentracija proteina/peptida) omogućiće definisanje korelacije između, prethodno određenih, molekularnih osobina proteina/peptida i mehanizama formiranja adsorpcionih filmova. Ispitivanje reoloških osobina proteinskih adsorpcionih filmova na granici faza ulje–proteinski rastvor daće uvid u njihovo ponašanje prilikom dilatacionih deformacija što je u vezi sa koloidnom stabilnošću emulzija i ponašanjem proteinskih adsorpcionih filmova prilikom izlaganja mehaničkom stresu. Ispitaće se emulgujuće osobine IPST, H1 i H2 pripremom emulzije tipa ulje u vodi, pri različitim uslovima (koncentracija proteina/peptida, pH, jonska jačina). Odrediće se disperzne osobine i sedimentaciona stabinost pripremljenih emulzija. Time će se definisati sposobnost IPST, H1 i H2 da stabilizuju emulzije pri raznim uslovima sredine realnih prehrambenih proizvoda.

2. TEORIJSKI DEO SA PREGLEDOM LITERATURE

2.1. ADSORPCIONI FILMOVI NA GRANICI FAZA TEČNO/TEČNO I TEČNO/GAS

2.1.1. ADSORPCIJA KOLOIDA NA GRANICU FAZA

Granica faza predstavlja uzani region između dve faze koje se međusobno razlikuju po hemijskoj i fizičkoj građi i osobinama, agregatnom stanju, sadržaju energije i drugom. Prema agregatnom stanju faza razlikuju se pet granica faza tečno/gasovito, tečno/tečno, tečno/čvrsto, čvrsto/gasovito i čvrsto/čvrsto (Đaković, 2006; McClements, 2004a), dok će se za potrebe ove disertacije razmatrati samo tečno/gasovito i tečno/tečno.

Molekuli na granici faza su uvek u dodiru sa molekulima druge faze pri čemu se njihovo energetska stanje razlikuje od energetske stanja molekula u unutrašnjosti faze. Naime, molekuli na granici faza tečnost/gas poseduju višak energije, koja se naziva slobodna površinska energija, a koja predstavlja rezultantnu silu koje deluju na molekule na granici faza i koja teži da molekule iz granice faza uvuče u unutrašnjost tečne faze svodeći slobodnu površinu granice faza na minimum. Na granici faza tečno/tečno javiće se različita uzajamna dejstva između molekula različitih faza kao što su privlačne sile istorodnih molekula iz unutrašnjosti faza (kohezivne sile) ali i privlačne sile molekula susedne faze sa kojima su u dodiru (adhezione sile). U oba slučaja, bilo da se radi o granici faza tečno/gas ili tečno/tečno, povećanje slobodne površine granice faza zahteva

izvestan utrošak rada. Utrošeni rad zavisi od površinskog (u slučaju granice faza tečno/gas), odnosno međupovršinskog napona (u slučaju granice faza tečno/tečno), koji predstavlja silu potrebnu da bi se na granici faza raskinula monomolekularna opna jedinične dužine. Površinski/međupovršinski napon je utoliko veći ukoliko su jače međumolekulske sile date tečnosti (Bos i Van Vliet, 2001; Đaković, 2006; Dukhin i sar. , 1995; Karbaschi i sar., 2014; McClements, 2004a; Wilde, 2000).

Tečna faza može da bude rastvor u kome su pored molekula rastvarača prisutni i molekuli rastvorene materije. U zavisnosti od međudejstva sa molekulima rastvarača molekuli rastvorene materije nalaze se u različitim koncentracijama u unutrašnjosti i na granici faza, i u različitoj meri utiču na površinski/međupovršinski napon. Ako rastvorena materija povećava površinski napon, koncentracija rastvorka na granici faza je manja u odnosu na koncentraciju u rastvoru. U suprotnom, rastvorena materija smanjuje površinski/međupovršinski napon ukoliko je njena koncentracija na granici faza veća od koncentracije u rastvoru (Đaković, 2006).

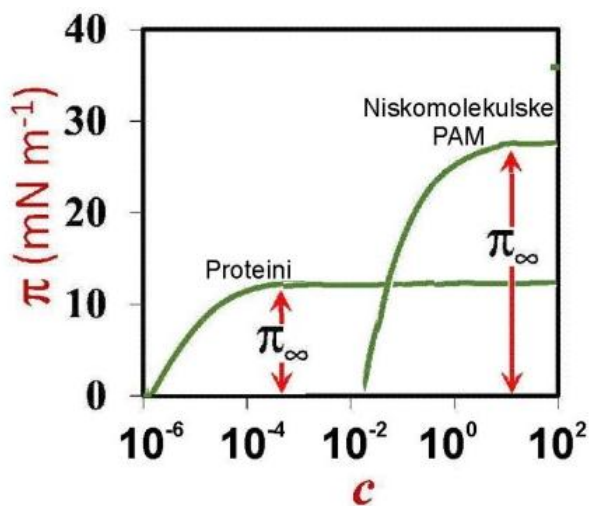
Materije koje smanjuju površinski/međupovršinski napon tečnosti nazivaju se površinski aktivne materije (PAM). Smanjenje površinskog/međupovršinskog napona usled adsorpcije PAM na granicu faza se iskazuje pomoću površinskog/međupovršinskog pritiska, π (mN/m), koji se dobija iz sledeće jednačine (Langevin, 2000):

$$\pi = \sigma_0 - \sigma \quad (1)$$

gde je σ_0 (mN/m) površinski/međupovršinski napon čiste granice faza vazduh/voda ili ulje/voda, respektivno, dok σ (mN/m) predstavlja površinski/međupovršinski napon vazduh/voda ili ulje/voda, respektivno, u prisustvu PAM. Što je PAM efikasnija u smanjivanju termodinamički nepovoljnih interakcija na granici faza, odnosno u snižavanju σ , to je veća vrednost π .

Vrednost π raste sa povećanjem koncentracije PAM kako u kontinualnoj fazi, tako i na granici faza, Γ , sve do postizanja ravnotežne koncentracije na granici faza, Γ_{∞} , kada se dostiže ravnotežni površinski/međupovršinski pritisak, π_{∞} (mN/m). Nakon dostizanja π_{∞} ,

π postaje nezavistan od daljeg povećanja koncentracije PAM, te zadržava vrednost $\pi=\pi_{\infty}$ (Katona i sar., 2010; McClements, 2004a; McClements i Jafari, 2018; Milanović i sar., 2014). Vrednost π_{∞} zavisi od karakteristika molekula PAM, načina njihovog pakovanja na granici faza i od interakcije sa molekulima kontinualne i disperzne faze (McClements, 2004a). Prema tome, površinski aktivne materije se mogu podeliti na niskomolekulske PAM koje karakteriše izrazita površinska aktivnost i značajno povećanje površinskog/međupovršinskog pritiska već pri malim koncentracijama i na materije koje pokazuju kontinuiran umeren rast površinskog/međupovršinskog pritiska sa povećanjem koncentracije, što je karakteristično za makromolekulske rastvore (proteini i polisaharidi) (slika 1). Vrednost ravnotežnog površinskog/međupovršinskog pritiska, π_{∞} , makromolekulskih rastvora je daleko niža od vrednosti π_{∞} koja se može postići upotrebom niskomolekulskih PAM (Đaković, 2006; Leal-Calderon i sar., 2007; McClements, 2004a; McClements i Jafari, 2018).



Slika 1. Zavisnost međupovršinskog pritiska od koncentracije PAM, makromolekulskih rastvora (protein) i niskomolekulske PAM (McClements, 2004a)

Niži ravnotežni površinski/međupovršinski pritisak proteina je posledica kompleksne strukture proteina. Za razliku od niskomolekulskih PAM koje imaju jasno definisanu polaranu glavu i nepolaran rep, hidrofilne i hidrofobne aminokiselinske rezidue se nalaze nasumično lokalizovane u primarnoj strukturi proteina. Obrazovanjem tercijerne strukture stvaraju se izdvojene hidrofilne i hidrofobne grupice na površini proteina. Prilikom adsorpcije na granicu faza ulja i vode, samo je jedan deo hidrofobnih grupa u poziciji da se adsorbuje, dok veći deo proteinskog molekula ostaje u vodenoj fazi usled konformacionih ograničenja. Kao posledica toga, pakovanje proteina na granici faza nije idealno, te i u slučaju zasićene granice faza proteinima, velika frakcija granice faza ostaje u stanju visoke slobodne energije, odnosno nižeg površinskog pritiska (Damodaran, 2005).

2.1.2. KINETIKA ADSORPCIJE

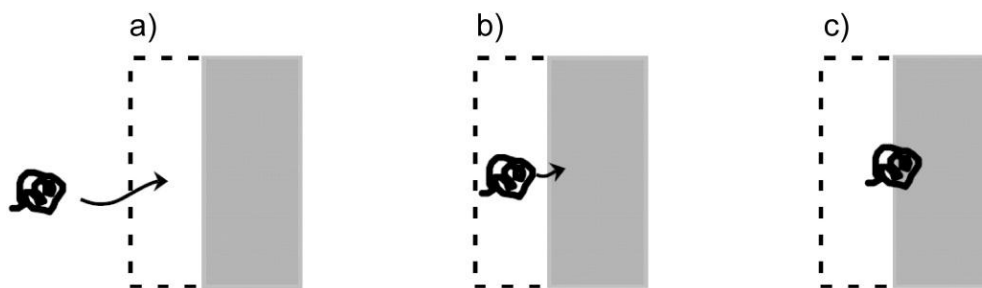
Površinski/međupovršinski pritisak rastvora PAM određuje se kada je granica faza u ravnotežnom stanju. Međutim, za mnoge industrijske i biološke procese su značajne informacije koje se dobijaju merenjem dinamičkog površinskog/međupovršinskog pritiska, odnosno kontinuiranim merenjem površinskog/međupovršinskog pritiska od trenutka formiranja granice faza pa sve do dostizanja ravnotežnog stanja. Površinski/međupovršinski napon, σ , novoformirane granica faza vazduh/rastvor PAM ili ulje/rastvor PAM, respektivno, se skoro ne razlikuje od površinskog/međupovršinskog napona čistog rastvarača, σ_0 , što znači da je površinski/međupovršinski pritisak ≈ 0 mN/m. Tokom vremena, π raste do postizanja ravnotežne vrednosti, π_∞ . Vremenski period potreban za uravnotežavanje granice faza varira od nekoliko milisekundi do nekoliko dana, u zavisnosti od koncentracije i tipa PAM (Dukhin i sar., 1995; Eastoe i Dalton, 2000).

Vreme potrebno za dostizanje ravnotežnog stanja granice faza zavisi od brzine transporta materija iz rastvora do granice faza, odnosno od difuzionih procesa, pa se

određivanje dinamičkog površinskog/međupovršinskog pritiska koristi za njihovo karakterisanje, odnosno za praćenje kinetike adsorpcije PAM na granicu faza (Dukhin i sar., 1995; Eastoe i Dalton, 2000; Karbaschi i sar., 2014).

Adsorpcija PAM na granicu faza predstavlja dinamičan proces koji se može prikazati kroz dva koraka (slika 2): I) kretanje PAM iz kontinualne faze do granice faza ulje i voda – difuzioni model (slika 2a–b); II) prelazak iz kontinualne faze na granicu faza – kinetičko–difuzioni model (slika 2b–c) (Dukhin i sar., 1995; Eastoe i Dalton, 2000; Karbaschi i sar., 2014; McClements, 2004a; Miller i sar., 2017; Osman i sar., 1999; Tang i Shen, 2015).

- I Difuzioni model: Prvi korak adsorpcije PAM se može predstaviti difuzionim modelom koji se zasniva na pretpostavci da je koncentracija PAM na granici faza tokom vremena uslovljena samo brzinom difuzije PAM kroz kontinualnu fazu (Langevin, 2000). Prema tom modelu, pri samom nastanku slobodne granice faza koncentracija PAM na granici faza, Γ , je niža od ravnotežne koncentracije, Γ_{∞} , a brzina kojom se dostiže Γ_{∞} se povećava sa povećanjem brzine difuzije PAM i povećanjem koncentracije PAM u kontinualnoj fazi.



Slika 2. Etape adsorpcije PAM na granicu faza: a–b) difuzija kroz kontinualnu fazu do granice faza, b–c) prelazak na granicu faza (McClements, 2004a)

Nakon dostizanja ravnotežnog stanja, $\Gamma = \Gamma_{\infty}$, brzina adsorpcije se usporava zbog zasićenosti granice faza PAM, tj. zbog smanjenog broja slobodnih mesta za adsorpciju na granici faza. Ovaj model je pogodan za interpretaciju adsorpcije pri samom početku formiranja granice faza kada je površina granice faza slobodna (Dukhin i sar., 1995; McClements, 2004a; Miller i sar., 2017).

Matematičkim putem proces adsorpcije PAM se može opisati Ward i Tordai jednačinom (Ward, A.F.H., Tordai, 1946):

$$\Gamma(t) = 2c_0 \sqrt{\frac{k_{diff}t}{3,14}} - 2\sqrt{\frac{k_{diff}}{3,14}} \int_0^{\sqrt{t}} c_s d(\sqrt{t-\tau}) \quad (2)$$

gde c_0 predstavlja koncentraciju rastvora PAM, k_{diff} je koeficijent difuzije, c_s je koncentracija PAM u blizini granice faza, t predstavlja vreme i τ variablu integracije (engl. *dummy variable of integration*) (Eastoe i Dalton, 2000). Prilikom formiranja granice faza, za etapu adsorpcije koja se odvija po difuzionom mehanizmu, kada $t \rightarrow 0$, jednačina se skraćuje:

$$\Gamma(t) = 2c_0 \sqrt{\frac{k_{diff}t}{3,14}} \quad (3)$$

Povezivanjem Γ sa σ preko jednačine (4):

$$\sigma - \sigma_0 = -nRT\Gamma \quad (4)$$

u kojoj je n koeficijent koji iznosi 1 za ne-jonske ili $n=2$ za jonske PAM, R je Bolcmanova konstanta, a T temperatura, i uvrštavanjem u jednačinu (3) dobija se konačna jednačina (Eastoe i Dalton, 2000; Fainerman i sar., 1994):

$$\sigma_0 - \sigma = 2nRTc_0 \sqrt{\frac{k_{diff}t}{3,14}} \text{ odnosno } \pi = 2nRTc_0 \sqrt{\frac{k_{diff}t}{3,14}} \quad (5)$$

Na osnovu ove jednačine, u toku adsorpcije kontrolisane isključivo difuzionim mehanizmom, funkcija zavisnosti π od $t^{1/2}$ je linearna a njen nagib predstavlja konstantu difuzije, k_{diff} (Fainerman i sar., 1994; Jarpa-Parra i sar., 2015; Tang i Shen, 2015).

II Kinetičko–difuzioni model: U praksi, kada se PAM nađe u neposrednoj blizini granice faza adsorpcija se ne odvija nesmetano, već je potrebno savladati jednu ili više energetskih barijera da bi došlo do adsorpcije. Prema tome, samo nekolicina PAM koje se nađu u neposrednoj blizini granice faza, zaista bude i adsorbovano. Kinetika adsorpcije u ovakvim sistemima prvenstveno zavisi od postojećih energetskih barijera, koje se mogu javiti iz nekoliko razloga (Eastoe i Dalton, 2000; Kralchevsky i Nagayama, 2000; McClements, 2004a; Ruíz-Henestrosa i sar., 2009):

- prisustva repulsivnih interakcija (elektrostatičkih, sternih, hidratacionih, itd.) između PAM i prethodno adsorbovanih molekula koji se već nalaze na granici faza;
- ispunjenosti uslova pod kojima će neka PAM adsorbovati na granicu faza. Na primer, globularni proteini će se adsorbovati na granicu faza samo ukoliko su njihovi hidrofobni delovi okrenuti ka granici faza u trenutku sudara;
- sposobnosti PAM da formiraju micide, pri čemu adsorpcija PAM na granicu faza zavisi od koncentracije, kako micela tako i monomera, kao i od dinamike formiranja, odnosno, raspadanja micela.

2.1.3. REOLOŠKE OSOBINE ADSORPCIONIH FILMOVA

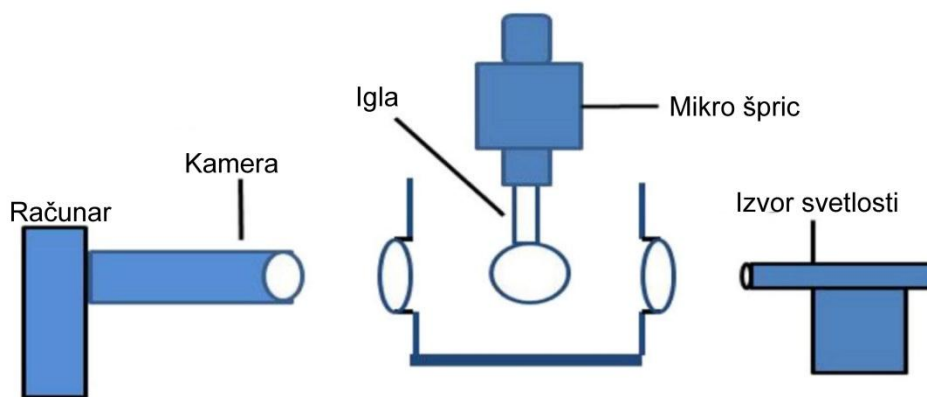
Reologija adsorpcionih filmova se bavi proučavanjem povezanosti deformacije adsorpcionih filmova u zavisnosti od sila koje na njih deluju u određenom vremenskom periodu (Bos i Van Vliet, 2001; Murray, 2002). Uzimajući u obzir činjenicu da su deformacije adsorpcionih filmova sastavni deo mnogih industrijskih procesa, uvid u ponašanje adsorpcionog filma tokom delovanja deformacije i karakterizacija relaksacionih procesa koji se odvijaju u strukturi adsorpcionog filma nakon prestanka delovanja sila pruža ključne informacije potrebne za modifikovanje i efikasnije upravljanje tim procesima (Karbashi i sar., 2014). Reološka analiza najčešće primenjuje smicajne i dilatacione deformacije. Smicajnim deformacijama se menja oblik adsorpcionog filma pri čemu njegova površina ostaje konstantna dok dilatacione deformacije podrazumevaju promenu površine adsorpcionog filma, bilo povećanjem ili smanjivanjem, zadržavajući prvobitni oblik adsorpcionog filma (Bos i Van Vliet, 2001; Dukhin i sar., 1995; Miller i sar., 2010; Ravera i sar., 2010). Razlika između dilatacione i smicajne reološke analize adsorpcionih filmova jeste to što na dilatacionu reologiju utiče i kinetika adsorpcije i desorpcije PAM, usled povećavanja i smanjivanja površine adsorpcionog filma, dok smicajna reologija posmatra samo materijal koji je sastavni deo adsorpcionog filma, pružajući više informacija o strukturama koje se tu nalaze (Miller i sar., 2010; Murray, 2002).

2.1.3.1. Dilataciona reologija adsorpcionih filmova

Dilatacione reološke osobine adsorpcionih filmova se mogu ispitivati primenom prolaznih i harmoničnih oscilacija površine granice faza. Kao odgovor na saopštene oscilacije dolazi do promena površinskog/međupovršinskog napona. Postoji nekoliko metoda za određivanje dilatacionih reoloških osobina adsorpcionih filmova putem merenja površinskog/međupovršinskog napona ali trenutno jedna od najeksploatisanijih metoda je metoda analize profila kapi ili mehurića – PAT metoda (Berry i sar., 2015;

Eastoe i Dalton, 2000; Mucic i sar., 2011). Prednosti PAT metode u odnosu na druge metode su upotreba veoma male zapremine uzorka, jednostavna kontrola temperature merenja i mogućnost merenja kako na granicama faza tečno/tečno tako i na granicama faza tečno/gas. Pored toga, vremenski interval merenja PAT metodom iznosi od 1 s do nekoliko dana, što omogućava praćenje i veoma sporih procesa koji se odigravaju na granicama faza (Berry i sar., 2015; Javadi i sar., 2013).

Princip PAT metode se bazira na analizi profila kapi ili mehurića. Tenziometar za analizu profila kapi je šematski prikazan na slici 3. Merenje na tenziometru za analizu profila kapi i mehurića se izvodi tako što se istisne kap tečnosti za analizu na vrhu igle mikro šprica koji se nalazi u komori za merenje ispunjenom gasom ili nekom drugom tečnosti u zavisnosti od toga koja se granica faza posmatra. Oblik istisnute kapi zavisi od dve sile koje deluju na kap, od površinskog/međupovršinskog napona koji teži da formirana kap bude sfernog oblika i od sile gravitacije koja izdužuje kap. Kamera snima kap osvetljenu izvorom svetlosti, koji obezbeđuje jasniju sliku kapi, i snimljene podatke šalje softveru za obradu podataka (Javadi i sar., 2013).



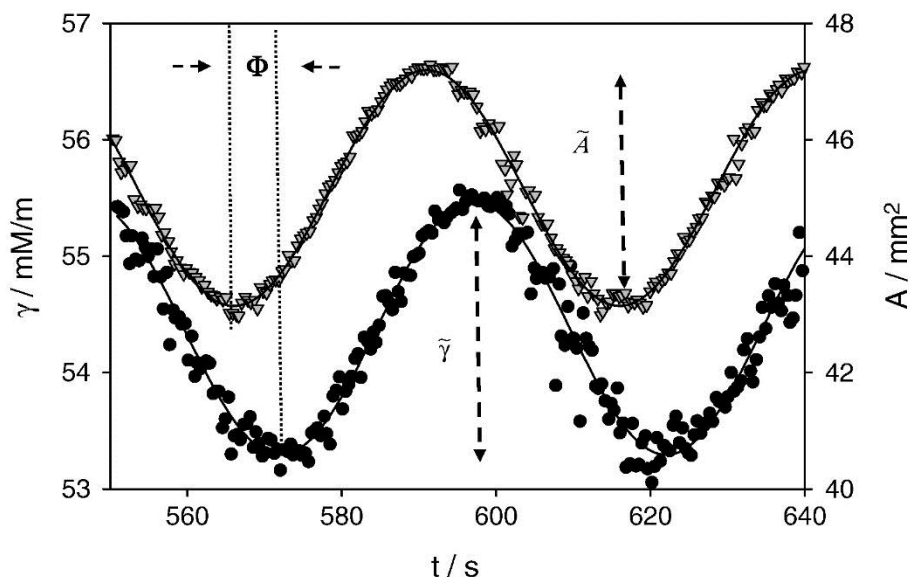
Slika 3. Šematski prikaz tenziometra za analizu profila kapi i mehurića (Soleimani i sar., 2018).



Slika 4. Šematski prikaz softverske obrade slike PAT metodom: slika viseće kapi, određivanje koordinata profila kapi i skup teoretski odogovarajućih profila eksperimentalnim podacima (Javadi i sar., 2013).

Zadatak softvera je da obradi dobijenu sliku kapi, odredi koordinate njenog profila i, zatim, određene koordinate fituje sa Gaus–Laplasovom (eng. *Gauss–Laplace*) jednačinom (Berry i sar., 2015; Javadi i sar., 2013; Miller i sar., 2010). Softverska obrada slike kapi je šematski prikazana na slici 4.

Nakon fitovanja eksperimentalnih parametara dobijaju se izlazni parametri merenja: površinski/međupovršinski napon, površina kapi, zapremina kapi i radius zakrivljene površine. Da bi se odredile dilatacione reološke osobine adsorpcionog filma na granici faza, istisnuta kap se podvrgava harmoničnim deformacijama u vidu povećanja i smanjenja površine kapi kontrolisanim istiskivanjem i uvlačenjem tečnosti (Miller i sar., 2010). Površinski/međupovršinski napon se menja proporcionalno saopštenoj oscilaciji i , u slučaju potpuno elastičnih adsorpcionih filmova, prati promenu površine filma bez kašnjenja. Međutim, u praksi se najčešće beleži određeno kašnjenje reakcije, Φ (s), površinskog/međupovršinskog napona, γ (mN/m), na saopštene deformacije, odnosno na oscilacije površine, A (mm²), slika 5, usled relaksacionih procesa koji se odvijaju u samom adsorpcionom filmu ili na granici faza (Mendoza i sar., 2014; Miller i sar., 2010; Ravera i sar., 2010).



Slika 5. Uticaj harmoničnih oscilacija površine adsorpcionog filma na površinski/ međupovršinski napon (Ravera i sar., 2010).

Furijer–ovom (eng. *Fourier*) analizom dobijenih eksperimentalnih rezultata dobijaju se dilatacioni reološki parametri adsorpcionog filma u vidu parova podataka kao što su (Miller i sar., 2010):

- moduo elastičnosti, E^* , i fazni ugao δ ;
- dilataciona elastičnost, E' , i dilatacioni viskozitet, E'' .

Dilataciona viskoelastičnost ili, kako se još naziva, moduo elastičnosti, E^* , je kompleksan parametar koji zavisi od frekvencije oscilacija, a koji po *Gibbs*–u predstavlja odgovor adsorpcionog filma u vidu promene međupovršinskog napona na dilatacione promene površine granice faza, A . *Gibbs*–ov dilatacioni modul čine dve komponente: elastična komponenta tj. dilataciona elastičnost, E' , koja predstavlja potencijalnu energiju adsorpcionog filma, i rasipna komponenta, takozvani dilatacioni viskozitet, E'' , koji predstavlja energiju potrebnu za relaksacione procese u adsorpcionom filmu. *Gibbs*–ov

dilatacioni modul se kvantitativno predstavlja kao kompleksan dilatacioni modul, E^* , koji čine realni i imaginarni deo, tj. elastična i viskozna komponenta, respektivno. Računa se po formuli (6) (Berton-Carabin i sar., 2018; Miller i sar., 2010; Ravera i sar., 2010; Ruíz-Henestrosa i sar., 2009)

$$E^* = E' + iE'' = \frac{\Delta\sigma}{(\Delta A/\bar{A}_0)} \cos(\delta) + i \frac{\Delta\sigma}{(\Delta A/\bar{A}_0)} \sin(\delta) \quad (6)$$

gde je \bar{A}_0 početna površina kapi pre oscilacija, zatim $\Delta\sigma$ i ΔA su promene površinskog/međupovršinskog napona i površine kapi, respektivno, usled harmoničnih oscilacija, a δ je fazni pomak između dilatacionih oscilacija i odgovora adsorpcionog filma na saopštene oscilacije. Za idealno elastične materijale, dilatacione oscilacije i odgovor adsorpcionog filma su u fazi, $\delta = 0^\circ$, a imaginarni deo jednak je nuli, dok kod idealno viskoznih adsorpcionih filmova δ iznosi 90° , a realna komponenta je jednaka nuli (Bos i Van Vliet, 2001; Karbaschi i sar., 2014; Mendoza i sar., 2014).

Na osnovu modula elastičnosti i njegovih sastavnih parametara mogu se karakterisati adsorpcioni filmovi u ravnotežnom stanju i prilikom re-ekvilibracije nakon primenjenih oscilacija adsorpcionog filma. Određivanjem dilatacionih reoloških parametara adsorpcionog filma dobijaju se informacije o difuzionoj razmeni, molekulskim reorijentacijama, površinskoj agregaciji, kao i o drugim kinetičkim procesima koji se mogu odvijati u adsorpcionom filmu (Ravera i sar., 2010). Pored toga, moduo elastičnosti, zajedno sa ostalim parametrima, se sve češće povezuje sa učinkom emulgatora u stabilizaciji kapljica emulzije tokom homogenizacije i nakon toga, u obezbeđivanju njihove stabilnosti (Berton-Carabin i sar., 2018; Karbaschi i sar., 2014; Miller i sar., 2010).

2.1.4. EMULGUJUĆE MATERIJE I STABILNOST EMULZIJA

Emulzije su dvo ili više fazni tečni disperzni sistemi kod kojih je najmanje jedna tečnost – disperzna (diskontinualna) faza, raspoređena u vidu kapljica u drugoj tečnosti – disperznom sredstvu (kontinualnoj fazi). Disperzna faza i disperzno sredstvo su međusobno nemešljivi. U zavisnosti od toga da li je vodena ili uljna faza kontinualna, razlikuju se dva osnovna tipa emulzija sistema: ulje–u–vodi (u/v) i voda–u–ulju (v/u) (Berton-Carabin i sar., 2018; Đaković, 2006; McClements, 2004a; Petrović, 2016).

Emulzije se dobijaju u postupku homogenizacije pri čemu se povećava granica faza između dve nemešljive tečnosti na račun uloženog rada. Utrošeni rad, A , se može predstaviti jednačinom (7) (Đaković, 2006; Petrović, 2016):

$$A = \sigma \Delta S \quad (7)$$

gde σ (mN/m) predstavlja međupovršinski napon, a ΔS (m²) povećanje slobodne površine koja dostiže i do nekoliko m² po gramu disperzne faze (Berton-Carabin i sar., 2018). Utrošeni rad ujedno povećava i potencijalnu energiju emulzija, čineći ih termodinamički nestabilnim sistemima koji teže da smanjenjem slobodne površine, zapravo smanje nepovoljne interakcije između dve faze. Kao posledica toga, dolazi do pokretanja fizičko–hemijskih mehanizama destabilizacije emulzija koji mogu dovesti do smanjenja stepena disperznosti ili, u krajnjem slučaju, do razrušavanja emulzije i izdvajanja uljne faze na površini preparata (Damodaran, 2005; Hu i sar., 2017; McClements, 2004b; Petrović, 2016).

Pojam “stabilnost emulzija” se odnosi na sposobnost emulzije da se odupre promenama fizičko–hemijskih karakteristika tokom vremena: što je emulzija stabilnija, to sporije dolazi do promene njenih osobina (Hu i sar., 2017; McClements, 2004a). Promene emulzija se usporavaju dodatkom supstanci poznatih kao emulgujuće materije koji imaju sposobnost održavanja emulzije u termodinamički nepovoljnom – metastabilnom stanju,

čineći emulziju kinetički stabilnom (Holmberg i sar., 2002; Leal-Calderon i sar., 2007; Milinković i sar., 2018).

2.1.4.1. Emulgujuće materije

Emulgujuće materije su površinski aktivne materije (PAM) koje se sastoje iz dva dela, hidrofilnog i hidrofobnog, što im omogućava da se tokom homogenizacije adsorbuju na površinu novoformiranih kapljica emulzije gde snižavaju međupovršinski napon, formiraju zaštitni adsorpcioni film i olakšavaju homogenizaciju (Berton-Carabin i sar., 2018; Đaković, 2006; Lam i Nickerson, 2013; Petrović, 2016). Napolarni deo određuje aktivnost emulgujućih materija, koja se karakteriše brojem adsorbovanih molekula na granici faza u odnosu na koncentraciju u kontinualnoj fazi. Sa druge strane, polarne grupe su odgovorne za rastvorljivost emulgujućih materija u vodenoj sredini i, u određenoj meri, se odupiru površinskoj aktivnosti (Dukhin i sar., 1995). Kao emulgujuće materije najčešće se koriste površinske aktivne materije niske molekulske mase, amfifilni biopolimeri (proteini i polisaharidi) i koloidne čestice (Berton-Carabin i Schroën, 2019; McClements, 2004a; McClements i Jafari, 2018; Milinković i sar., 2018).

S obzirom na raznolikost molekulskih i fizičko–hemijskih karakteristika emulgujućih materija, postoje značajne razlike u njihovoj sposobnosti da stabilizuju novoformirane kapljice i obezbede stabilnost emulzija u toku određenog vremenskog perioda (McClements, 2004a). Među karakteristike koje određuju efikasnost emulgujućih materija da stabilizuju kapi emulzije prilikom homogenizacije spadaju (Bos i Van Vliet, 2001; McClements, 2004a; Ozturk i McClements, 2016):

- površinska aktivnost – sposobnosti adsorbovanja na granicu faza ulje–voda, odnosno, posedovanje polarnih i nepolarnih grupa u položaju koji omogućava adsorbovanje na granicu faza;
- snižavanje međupovršinskog napona;

- stabilizacija kapljica – stvaranje jakih odbojnih sila, poput sternih ili elektrostatičkih odbojnih sila, koje štite kapljice od agregacije prilikom sudara;
- kinetika adsorpcije – prilikom homogenizacije emulzije, emulgjujuće materije se moraju adsorbovati na površinu kapljica u što kraćem vremenskom periodu ne bi li smanjili međupovršinski napon i sprečili agregaciju kapljica;
- pakovanje emulgjujućih materija na površini kapi – što je gušće pakovanje emulgjujuće materije na površini kapi, to je potrebna veća koncentracija da stabilizuje datu emulziju.

Efikasnost emulgjujućih materija prilikom formiranja emulzije se može porediti na osnovu minimalnog prosečnog prečnika kapi koje data emulgjujuća materija može da stabilizuje pri datoj koncentraciji, zatim određivanjem minimalne koncentracije emulgjujuće materije potrebne da bi se pripremila emulzija određenog prosečnog prečnika kapi ili praćenjem promene prosečnog prečnika kapi emulzije u zavisnosti od koncentracije emulgjujuće materije (McClements, 2004a; Ozturk i McClements, 2016). Uprkos činjenici da veličina kapi emulzije prvenstveno zavisi od rada koji je utrošen prilikom homogenizacije, ukoliko emulgjujuća materija nije dovoljno efikasna u stabilizovanju novonastalih kapi ili je nema u dovoljnoj koncentraciji da pokrije novonastalu granicu faza, veličina kapi će zavistiti isključivo od emulgjujućeg svojstva ili količine emulgjujuće materije (McClements i Jafari, 2018; Ozturk i McClements, 2016).

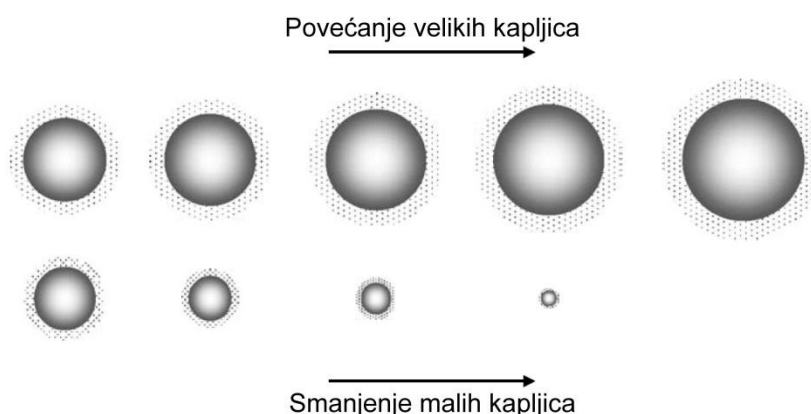
Emulgjujuća svojstva emulgjujućih materija se najčešće kvantifikuju i izražavaju u vidu emulzione aktivnosti, emulzionog kapaciteta i emulzione stabilnosti. Emulziona aktivnost se odnosi na maksimalnu površinu granice faza koju može stabilizovati masena jedinica emulgjujuće materije. Emulzioni kapacitet predstavlja maksimalnu zapreminu/masu ulja koje može biti emulgovano jednom masenom jedinicom emulgjujuće materije u određenim uslovima, a emulziona stabilnost karakteriše

sposobnost emulgujuće materije da formira emulziju čije osobine ostaju nepromenjene u određenom vremenskom periodu pri određenoj temperaturi (Panyam i Kilara, 1996).

2.1.4.2. Vidovi nestabilnosti emulzija

Destabilizacija emulzije se može manifestovati na nekoliko načina, pri čemu su za nepovratno razrušavanje emulzija, koje vodi u separaciju faza, zaslužna dva mehanizma: *Ostwald*–ovo zrenje i koalescencija. Pored ova dva mehanizma stabilnost emulzije narušavaju i povratni procesi poput gravitacione nestabilnosti, flokulacije i inverzije faza (Đaković, 2006; Leal-Calderon i sar., 2007).

***Ostwald*–ovim zrenjem** se naziva proces koji se odigrava bez međusobnog kontakta kapljica, kada manje kapljice gube svoj sadržaj difuzijom disperzne faze kroz kontinualnu fazu usled velike razlike u Laplasovom (engl. *Laplace*) pritisku između kapljica različite veličine, odnosno velike razlike u zakrivljenosti površine kapljica, pri čemu se zapremina većih kapi povećava. Prema tome, kao posledica *Ostwald*–ovog zrenja dolazi do povećanja prosečnog prečnika kapi u emulziji (Damodaran, 2005; Leal-Calderon i sar., 2007; Petrović, 2016). *Ostwald*–ovo zrenje prikazano je na slici 6.



Slika 6. Šematski prikaz *Ostwald*–ovog zrenja (McClements, 2004a)

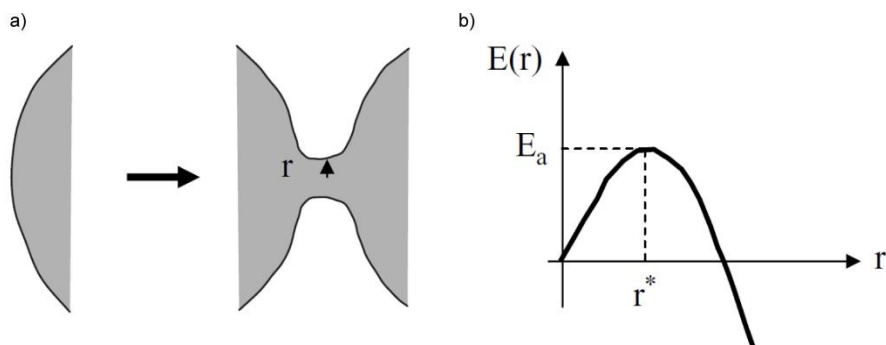
Na osnovu Laplasove jednačine:

$$\Delta P = 2\sigma/r \quad (8)$$

gde je ΔP Laplasov pritisak, σ površinski/međupovršinski napon i r poluprečnik kapljice, može se zaključiti da što je veći poluprečnik kapljica to je manji njihov Laplasov pritisak. *Ostwald*–ovo zrenje je karakteristično za nanoemulzije, a može da predstavlja problem i u emulzijama koje sadrže arome ili eterična ulja koje karakteriše relativno visoka rastvorljivost disperzne faze u vodenoj sredini (Berton-Carabin i sar., 2018).

Koalescencija predstavlja proces kada kapljice u emulzijama vremenom gube svoju individualnost usled razrušavanja zaštitnog adsorpcionog filma emulgjujuće materije na granici faza i sjedinjavanja dve ili više kapljica u jednu veću kapljicu. Do razrušavanja zaštitnog omotača dolazi nastajanjem otvora koji kada dostigne kritičnu veličinu postaje nestabilan i nakon toga se samo povećava do konačnog spajanja dve kapi (Đaković, 2006; Petrović, 2016; Van Aken i sar., 2003). Ukoliko se uzme da je za stvaranje otvora veličine r potrebna energija $E(r)$, tada je za formiranje otvora kritične veličine r^* potrebna energija $E(r^*)$ koje zapravo predstavlja aktivacionu energiju procesa nukleacije otvora kritične veličine, što je šematski predstavljeno na slici 7. U slučaju da je otvor manji od r^* , odnosno da je $E(r) < E(r^*)$, kapljice zadržavaju svoju individualnost, a otvor adsorpcionog filma na granici faza se smanjuje i na kraju nestaje (Leal-Calderon i sar., 2007; McClements, 2004a).

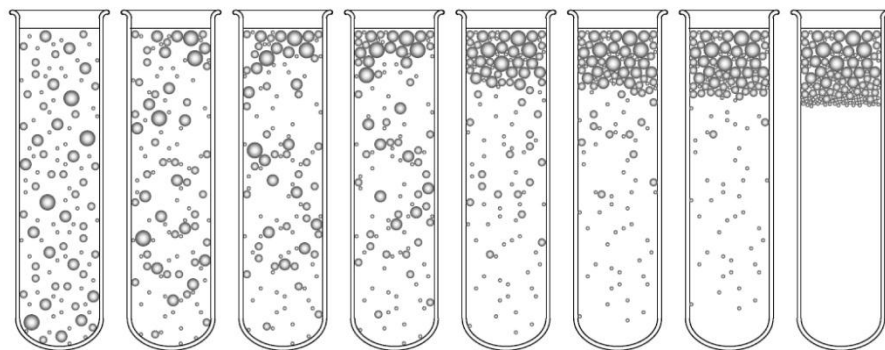
Energija aktivacije adsorpcionih filmova se povećava sa boljim pakovanjem površinski aktivnih materija na granici faza: što su PAM gušće pakovane to je bolja metastabilnost adsorpcionog filma. Pored toga, povećanjem gustine pakovanja PAM poboljšava se i dilataciona elastičnosti adsorpcionih filmova koja ima ključnu ulogu u suzbijanju termičkih i mehaničkih deformacija adsorpcionog filma i u smanjenju verovatnoće dostizanja aktivacione energije koja dovodi do stvaranja otvora kritične veličine (Leal-Calderon i sar., 2007).



Slika 7. a) Šematski prikaz razrušavanja adsorpcionog filma na granici faza nukleacijom otvora i b) promena potrebne energija za nukelisanje otvora određene veličine (Leal-Calderon i sar., 2007).

Koalescencija se ubrzava ukoliko se povećava verovatnoća sudara između kapljica, kod koncentrovanih disperznih sistema, kod sistema sa malim viskozitetom kontinualne faze ili ukoliko joj prethodi neki drugi oblik nestabilnost poput flokulacije ili gravitacione nestabilnosti. Pri izrazitoj koalescenciji dolazi do separacije faza i na kraju do potpunog razrušavanja emulzije (Berton-Carabin i Schroën, 2019; Leal-Calderon i sar., 2007; McClements, 2004a).

Gravitaciona nestabilnost označava pojavu separacije kapljica pod uticajem zemljine teže pri čemu se u zavisnosti od razlike u gustinama disperzne faze i disperznog sredstva kapljice talože na dnu emulzije – sedimentacija, ili isplivavaju na površinu – kriming (engl. *creaming*), slika 8 (Hu i sar., 2017; McClements, 2004a; Milinković i sar., 2018; Robins, 2000). Emulzija se razdvaja na sloj u kome je koncentrovana disperzna faza – krem, i na sloj u kome je koncentrovano disperzno sredstvo – serum. Raspodela veličina kapi emulzije, kao i veličina kapljica emulzije podlegle gravitacionoj nestabilnosti ostaje nepromenjena budući da kapljice zadržavaju svoju individualnost.



Slika 8. Šematski prikaz gravitacione nestabilnosti – kriming (McClements, 2004a)

Prema Stoksovoj jednačini brzina kojom se odvija neki od mehanizama gravitacione nestabilnosti, v , je direktno proporcionalna kvadratu prečnika kapljica, r^2 , i razlici u gustinama disperzne, ρ , i kontinualne faze, ρ_0 , i obrnuto proporcionalna viskozitetu kontinualne faze, η (Berton-Carabin i sar., 2018; Chanamai i McClements, 2000; Đaković, 2006; Damodaran, 2005; McClements i Jafari, 2018):

$$v = \frac{2(\rho - \rho_0)g}{9\eta} r^2 \quad (9)$$

Predznak brzine gravitacione nestabilnosti određuje pojavu sedimentacije (–) i kriminga (+). Tokom separacije kapljica u polidisperznim emulzijama javlja se frakcionisanje po veličini kapljica od vrha emulzije prema dnu usled veće brzine izdvajanja kapljica većeg prečnika što dovodi do pojave koncentracionog gradijenta disperzne faze i gradijenta veličina kapljica po vertikali emulzije (Đaković, 2006; McClements, 2004a).

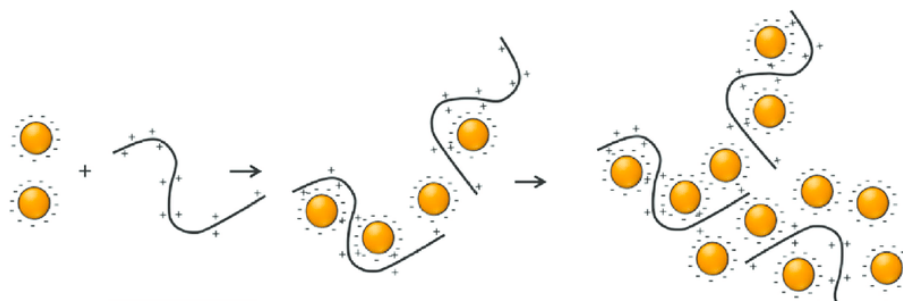
Brzina gravitacione nestabilnosti može da odstupa od brzine definisane Stoksovom jednačinom iz nekoliko razloga (McClements, 2004a):

- ukoliko je kontinualna faza nenjutnovski fluid čij viskozitet zavisi od brzine ili napona smicanja, što je često izraženo kod makromolekulskih rastvora;
- visoke koncentracije disperzne faze pri čemu je uticaj hidrodinamičkih interakcija između kapljica prilikom kretanja značajan;
- jako naelektrisanih kapljica emulzije kada električni dvojni sloj povećava efektivnu zapreminu kapljica, usporava njihovo kretanje i sprečava međusobno približavanje kapljica;
- kristalizacije uljane faze, bilo da se radi o disperznoj fazi kada se povećava njena gustina ili o kontinualnoj fazi kada nastaje trodimenzionalna struktura masnih kristala koja sprečava sedimentaciju vodene faze;
- Braunovog kretanja kapljica emulzije koje značajno utiče na brzinu gravitacione nestabilnosti kod emulzija sa prečnikom kapljica manjim od 0,1 μm ;
- flokulacije.

Flokulacija je proces sjedinjavanja kapljica koje su se našle u neposrednom kontaktu stvarajući agregate/flokulule različitih oblika i dimenzija pri čemu kapljice zadržavaju svoju individualnost. Nastali agregati se ponašaju kao nove sekundarne čestice i postaju nove kinetičke celine koje mogu da ubrzaju gravitacionu nestabilnost i pospeše koalescenciju (Đaković, 2006). Brzina flokulacije zavisi od frekvencije sudara između kapljica emulzije – broja sudara u jedinici vremena, i od efikasnosti sudara, odnosno od broja sudara koji dovode do spajanja kapljica (Gregory, 2013; McClements, 2004a).

Frekvencija sudara kapljica zavisi od dominantnog mehanizma koji dovodi do sudara: Braunovo kretanje, gravitaciono ubrzanje ili dejstvo mehaničke sile. Pored toga, frekvencija sudara se dodatno povećava sa povećanjem koncentracije disperzne faze dok povećanje viskoziteta kontinualne faze smanjuje ili čak onemogućava sudaranje kapljica.

Do flokulacije kapljica prilikom sudara dolazi kada privlačne sile koje deluju između kapljica nadjačaju odbojne sile. Prema tome, faktori koji utiču na efikanost

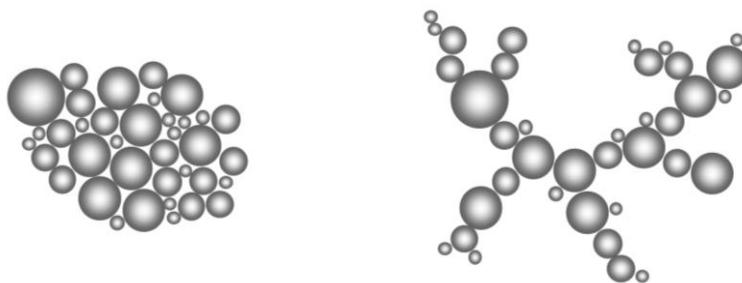


Slika 9. Šematski prikaz Bridžing flokulacije.

flokulacije zavise od načina na koji je data emulzija stabilizovana i tipa prisutne površinski aktivne materije. Na primer, efikasnost sudara kapljica emulzija stabilizovanih elektrostatičkim odbojnim silama zavisi od samog naelektrisanja kapljica, pH vrednosti i jonske jačine sredine. Sa druge strane, u emulzijama koje u svom sastavu sadrže makromolekule za povećanje efikasnosti sudara može biti odgovorna takozvana bridžing (engl. *bridging*) flokulacija koja predstavlja adsorpciju makromolekula na površinu više kapljica disperzne faze (McClements, 2004a), slika 9. Bridžing flokulacija se uglavnom sprečava prisustvom dovoljne količine makromolekula da u potpunosti prekriju granicu faza.

Depleciona (engl. *depletion*) flokulacija predstavlja flokulaciju u prisustvu neadsorbovanih koloidnih čestica, poput makromolekula ili micela surfaktanta, u kontinualnoj fazi emulzije. Neadsorbovane koloidne čestice povećavaju privlačne sile između kapljica usled osmotskog efekta koji potiče od razlike u njihovoj koncentraciji u kontinualnoj fazi i u omotaču kapljica (Gregory, 2013; McClements, 2004a).

Struktura nastalih flokula zavisi od prirode koloidnih i hidrodinamičkih interakcija kapljica: ukoliko je energija privlačenja između kapljica relativno jaka, formiraju se flokule otvorene strukture, u suprotnom, dolazi do formiranja gusto pakovanih flokula, slika 10 (McClements, 2004a).



Slika 10. Struktura flokula: gusto pakovana (levo) i flokula otvorene strukture (desno) (McClements, 2004a).

Inverzija faza predstavlja zamenu dispezne faze i disperznog sredstva pri čemu emulzija prelazi iz jednog tipa u drugi, tačnije iz tipa u/v u tip v/u i obrnuto. Inverzija faza se često koristi kao spontani proces emulgovanja. Do inverzije faza najčešće dolazi usled promene (povećanja) zapreminskog udela dispezne faze, temperature, pritiska, jonske jačine ili upotrebom kosurfaktanta (Berton-Carabin i Schroën, 2019; Đaković, 2006; Leal-Calderon i sar., 2007; Petrović, 2016).

2.2. PROTEINSKI ADSORPCIONI FILMOVI

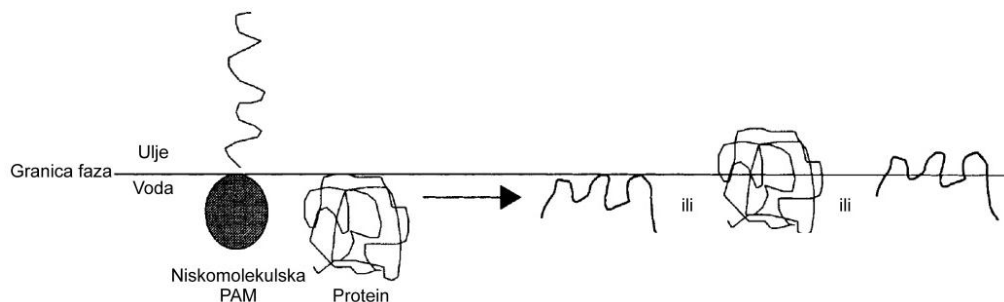
Zahvaljujući svojoj površinskoj aktivnosti, proteini pokazuju tendenciju adsorpcije na granicu faza (Milanović i sar., 2014; Sovilj i sar., 2013). Ipak, površinska aktivnost različitih proteina se značajno razlikuje, i pored činjenice da su svi proteini amfifilni molekuli od kojih većina sadrži polarne i nepolarne aminokiselinske rezidue u sličnom odnosu. Razlike u površinskoj aktivnosti potiču od fizičkih, hemijskih i konformacionih karakteristika proteina, odnosno od veličine, oblika, sekvence i sastava amino kiselina, naelektrisanja i njegove distribucije, a zatim i od uticaja spoljašnjih faktora poput pH vrednosti i jonske jačine sredine (Rodriguez Patino i Pilosof, 2011).

Adsorpcija proteina na granicu faza počinje kao i kod drugih površinski aktivnih materija difuzijom iz rastvora i zatim adsorpcijom na granicu faza. Međutim, ono po čemu se proteini razlikuju od niskomolekulskih PAM su procesi koji slede nakon adsorpcije na granicu faza (Dickinson, 2011; Joshi i sar., 2012; Lam i Nickerson, 2013; Rodriguez Patino i Pilosof, 2011):

- I **Konformaciona reorganizacija.** Kada se protein adsorbuje na granicu faza, tada obično dolazi do reorganizacije molekula, tačnije, do promena u njegovoj konformaciji, pri čemu se dodatno otkrivaju hidrofobni delovi prema uljnoj fazi, odnosno zauzima termodinamički najpovoljniju konformaciju (Nnanna i Xia, 2001; Van Aken i sar., 2003). Konformacione promene proteina na granici faza su ireverzibilne i nazivaju se „površinska denaturacija“ (Bos i Van Vliet, 2001; McClements, 2004b; Van Aken i sar., 2003; Yampolskaya i Platikanov, 2006). Površinska denaturacija zavisi od kinetičkih ograničenja proteina (fleksibilnosti proteina, distribucije

hidrofilnih/hidrofobnih delova) i hidrofobnosti uljne faze, ali je izraženija ukoliko individualni proteinski molekuli imaju više vremena i prostora (manja površinska koncentracija) na granici faza da se „rašire“ (Bos i Van Vliet, 2001; McClements, 2004b; Zhai i sar., 2013). Stoga, molekul proteina, za razliku od niskomolekulskih PAM, ima nekoliko mogućih konformacija koje može da zauzme na granici faza, slika 11. Globularni proteini, zbog svoje rigidne strukture, slabije podležu promenama konformacije u odnosu na fleksibilne proteine, dozvoljavajući promene konformacije na nivou tercijerne strukture pri čemu većina sekundarne strukture proteina ostaje u nativnom stanju (Leal-Calderon i sar., 2007; Nnanna i Xia, 2001).

II **Strukturna konsolidacija** – finalna faza nastajanja proteinskog adsorpcionog filma – bilo staklastog (engl. *glass-like*) ili gelastog (engl. *gel-like*) sloja gusto pakovanih proteinskih molekula. U ovoj fazi, dolazi do intermolekularnog povezivanja proteina (jonskim, hidrofobnim, vodoničnim ili disulfidnim vezama), stvaranja defekata u adsorpcionom filmu ili čak do lokalnog razdvajanja faza. Ovi procesi određuju dugoročne mehaničke osobine adsorpcionog filma (Leal-Calderon i sar., 2007).



Slika 11. Konformacija niskomolekulske PAM i proteina na granici faza (Bos i Van Vliet, 2001)

Kinetika adsorpcije proteina u fazi konformacione reorganizacije i strukturne konsolidacije na granici faza se kvantifikuje primenom jednačine prvog reda koja opisuje ovaj fenomen (10):

$$\ln((\pi - \pi_t)/(\pi - \pi_{400})) = -k_i t \quad (10)$$

gde su π , π_t i π_0 međupovršinski pritisci na kraju merenja, nakon vremena t , i na početku merenja, respektivno, a k_i predstavlja konstantu brzine prvog reda. Grafički prikaz ove jednačine obično ima dva ili više linearnih regiona. Prvi linearni region se vezuje za prodiranje molekula proteina na granicu faza i otvaranje njihove strukture, pri čemu njegov nagib predstavlja konstantu adsorpcije, k_{ads} , dok drugi linearni region predstavlja fazu prilagođavanja proteinske strukture granici faza – strukturnu konsolidaciju, sa nagibom koji predstavlja konstantu molekularne reorganizacije, k_R (Jarpa-Parra i sar., 2015; Rodríguez Niño i sar., 2005; Ruíz-Henestrosa i sar., 2009; Tang i Shen, 2015). Vreme potrebno za dostizanje ravnotežnog površinskog/međupovršinskog pritiska, odnosno kraja merenja, usled prilagođavanja strukture proteina može da iznosi nekoliko sati ili čak dana (Hoffmann i Reger, 2014; Rangsansarid i Fukada, 2007; Yampolskaya i Platikanov, 2006).

Kod proteinskih rastvora niske koncentracije ili rastvora čija je pH vrednost bliska izoelektričnoj tački proteina, javlja se indukcion period – period početnog „kašnjenja“ promene međupovršinskog pritiska (engl. *lag period*) usled agregacije proteina u izoelektričnoj tački i manje fleksibilnosti i podložnosti promenama koformacije, koje su karakterističnije za globularne proteine (Damodaran, 2005; Joshi i sar., 2012; McClements, 2004b; Rodriguez Patino i Pilosof, 2011).

Ono što izdvaja proteine kao emulgujuće agense, u odnosu na niskomolekulske PAM, je obrazovanje viskoelastičnog adsorpcionog filma na granici faza ulja i vode (Dan i sar., 2013; Dickinson, 1999). Elastičnost proteinskog adsorpcionog filma uveliko nadmašuje elastične osobine adsorpcionih filmova niskomolekulskih PAM (Hoffmann i Reger, 2014; Sagis i Scholten, 2014). Naime, u toku konformacionih promena strukture

proteina može doći do stvaranja intermolekularnih veza između proteina u adsorpcionom filmu što doprinosi povećanju elastičnosti proteinskog adsorpcionog filma (Damodaran, 2005; Lam i Nickerson, 2013; Leal-Calderon i sar., 2007; Sagis i Scholten, 2014). Mehanička otpornost proteinskih adsorpcininskih filmova povećava stabilnost emulzija, odnosno otpornost prema koalescenciji i *Ostwald*-ovom zrenju: što je film elastičniji, to je otporniji na koalescenciju (Amine i sar., 2014; McClements i Gumus, 2016; Nnanna i Xia, 2001; Sagis i Scholten, 2014).

Globularni proteini uglavnom formiraju gusto pakovane, tanke i staklaste (engl. *glass-like*) adsorpcione filmove koji pokazuju znake pucanja usled kompresije ili ekspanzije te su emulzije stabilizovane globularnim proteinima uglavnom putem elektrostatičkih odobnih sila (Bos i Van Vliet, 2001; McClements, 2004b; Sagis i Scholten, 2014; Van Aken i sar., 2003; Zhai i sar., 2013). Upravo zbog toga, nemodifikovani biljni proteini, koji poseduju globularnu strukturu, pokazuju najbolje emulgujuće osobine u sistemima čija je pH vrednosti ispod njihove izoelektrične tačke, odnosno, pH ispod 4 (Van Vliet i sar., 2002).

Pored biljnih proteina čije su emulgujuće sposobnosti dokazane, poput proteina soje (Bengoechea i sar., 2010; Fasolin i sar., 2019; Jeske i sar., 2018; Joye i McClements, 2014; Nishinari i sar., 2014; Shao i Tang, 2014), uljane repice (Karaca i sar., 2011a; Pojić i sar., 2018; Tan i sar., 2014; Wu i Muir, 2008), pšeničnog glutena (Bengoechea i sar., 2010), proteina pirinča (Romero i sar., 2012) i kukruznog zeina (Day, 2013; Taha i sar., 2019), izučavaju se i proteini iz alternativnih biljnih izvora:

- žitarica: ječam (Houde i sar., 2018), proso (Nazari i sar., 2018; Singh i sar., 2018);
- leguminoza: grašak (Amine i sar., 2014; Burger i Zhang, 2019; Liang i Tang, 2013), leblebija (Papalamprou i sar., 2010), sočivo (Avramenko i sar., 2013; Joshi i sar., 2012; Karaca i sar., 2011b; Ladjal Ettoumi i sar.,

2016), kikiriki (Moure i sar., 2006; Taha i sar., 2019), rogač (Huang i sar., 2001; Lawal, 2004);

- koštuničavog voća: indijski orah (Neto i sar., 2001; Yuliana i sar., 2014), lešnik (Gul i sar., 2018; Moure i sar., 2006; Turan i sar., 2015b, 2015a), badem (Sze-Tao i Sathe, 2000);
- uljarica: lan (Karaca i sar., 2011a), seme pamuka (Tsaliki i sar., 2004), suncokret (Day, 2013; Malik i Saini, 2018; Moure i sar., 2006; Pojić i sar., 2018; Rodrigues i sar., 2012; Sara i sar., 2020), susam (Achouri i sar., 2012; Khalid i sar., 2003), seme tikve (Rezig i sar., 2013; Popović i sar., 2013).

2.3. PROTEINI SEMENA TIKVE (*Cucurbita Pepo*)

2.3.1. BILJNI PROTEINI KAO NOSAČI KOLOIDNE FUNKCIONALNOSTI

Da bi se našli na listi sastojaka nekog proizvoda proteini moraju da zadovolje određene nutritivne i funkcionalne standarde. Sa nutritivnog stanovišta biljni proteini predstavljaju makronutritijent visoke nutritivne vrednosti (Burger i Zhang, 2019). Uprkos činjenici da su biljni proteini iz pojedinačnih biljnih izvora deficitarni u pojedinim esencijalnim masnim kiselinama, uz određenu kombinaciju proteina iz različitih biljnih izvora, oni mogu da zadovolje potrebe organizma za esencijalnim masnim kiselinama (Alves i Tavares, 2019; Day, 2013). Zahvaljujući svojoj biološkoj aktivnosti, utvrđeno je da proteini biljnog porekla imaju pozitivan uticaj na zdravlje, pozitivno utiču na crevnu floru i smanjuju rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa (Aider i Barbana, 2011; Fasolin i sar., 2019; Foegeding i Davis, 2011; Nishinari i sar., 2014). Sa druge strane, nedostaci biljnih proteina se ogledaju u njihovoj nižoj digestiji i bioraspoloživosti u odnosu na proteine animalnog porekla, kao i prisustvu antinutritivnih komponenata poput: glukozinolata, tripsin inhibitora, tanina, eruka masne kiseline itd. (Day, 2013; Fasolin i sar., 2019; Foegeding i Davis, 2011; Moure i sar., 2006; Pojić i sar., 2018).

Funkcionalne osobine proteina postaju važnije od nutritivnih karakteristika kada se protein nalazi u proizvodu u svojstvu funkcionalnog sastojka a ne glavne komponente (Schwenke, 2001). Jedan od glavnih preduslova da bi protein ispoljio neku funkciju je dobra rastvorljivost (Aider i Barbana, 2011; Damodaran, 2005; Lam i Nickerson, 2013). Rastvorljivost proteina predstavlja termodinamičku manifestaciju ravnoteže interakcija između proteina i rastvarača i interakcija između molekula proteina (Hoffmann i Reger,

2014). Ona zavisi od sekvence i sastava amino kiselina koje čine strukturu proteina, odnosno, od njihove hidrofobnosti, polarnosti i naelektrisanja. Drugim rečima, prisustvo hidrofobnih grupa pospešuje intermolekularne interakcije proteinskih lanca što se manifestuje kao smanjenje rastvorljivosti. Sa druge strane, prisustvo polarnih i naelektrisanih amino kiselinskih ostataka doprinosi boljoj rastvorljivosti proteina (Bessada i sar., 2019; Nnanna i Xia, 2001).

Pored same strukture, na rastvorljivost proteina značajno utiče i sredina u kojoj se nalazi, pre svega pH vrednost i jonska jačina. Rastvorljivost proteina je najniža kada je pH vrednost sredine blizu izoelektrične tačke proteina koja se kod biljnih proteina uglavnom nalazi u blago kiseloj sredini, najčešće pri pH 4–5 (Yuliana i sar., 2014). U izoelektričnoj tački ukupno naelektrisanje proteina je jednako nuli, što dovodi do slabljenja elektrostatičkih odbojnih sila između molekula proteina, smanjene hidratacije i, konačno, do njihovog taloženja. Suprotno tome, snižavanjem pH vrednosti sredine ispod izoelektrične tačke ili povećanjem iznad izoelektrične tačke, preovladava pozitivno, odnosno negativno naelektrisanje, respektivno, a rastvorljivost proteina se povećava (Amine i sar., 2014; Bessada i sar., 2019; Deng i sar., 2011; Hoffmann i Reger, 2014; Lawal, 2004).

Promene rastvorljivosti u zavisnosti od jonske jačine su rezultat više efekata koji se tom prilikom ispoljavaju: elektrostatički efekat, hidrofobni efekat, jonska specifičnost, itd. (Maurer i sar., 2011). Naime, povećanjem jonske jačine u rastvoru proteini vezuju prisutne jone, pri čemu oni gube svoje naelektrisanje. Pri malim jonskim jačinama, joni soli, posebno anjoni, se slabo vezuju za naelektrisane proteinske grupe i rastvorljivost se blago povećava – *salting-in* efekat. Daljim povećanjem jonske jačine ukupno naelektrisanje proteina opada, intenziviraju se interakcije između proteinskih molekula, a rastvorljivost opada – *salting-out* efekat (Joshi i sar., 2012; Marcone, 1999; Nnanna i Xia, 2001; Yalçın i Çelik, 2007).

2.3.2. IZVORI BILJNIH PROTEINA

Najvrednije izvore biljnih proteina predstavljaju žitarice i uljarice. Žitarice, kao osnovni izvor biljnih proteina za ljudsku ishranu, obezbeđuju udeo od oko 50% od ukupno konzumiranih proteina, dok se proteinski potencijal uljarica, koje se gaje prvenstveno za proizvodnju ulja, još uvek potcenjuje (Potter i Hotchkiss, 1995). Naime, uljarice u poređenju sa žitaricama, ne samo da sadrže dva do četiri puta više proteina, već ti proteini poseduju i veću nutritivnu vrednost (Day, 2013; Marcone, 1999; Marcone i sar., 1998). Pored toga, proteini uljarica se prilikom procesa izdvajanja ulja koncentrišu u uljanoj pogači, sekundarnom proizvodu u procesu proizvodnje ulja, koja važi za jedan od ekonomski najisplativijih izvora biljnih proteina. Sadržaj proteina u uljanoj pogači se kreće u rasponu od 15–60% (Moure i sar., 2006; Pojić i sar., 2018). Proporcionalno proizvodnji ulja, najdostupnije su uljane pogače soje, uljane repice, suncokreta, pamuka i kikirikija (Moure i sar., 2006; Pojić i sar., 2018; Rodrigues i sar., 2012). Pored navedenih uljanih pogača sve veću pažnju tržišta dobijaju uljane pogače koje se dobijaju u proizvodnji hladnoceđenih ulja iz alternativnih uljanih izvora (lešnika, semena tikve, semena grožđa, konoplje, susama, oraha), pre svega zbog blažih uslova u toku procesa proizvodnje (Day, 2013; Pojić i sar., 2018). Prilikom hladnog ceđenja ulja, ulje se izdvaja isključivo upotrebom mehaničke sile pri temperaturi nižoj od 50°C, bez upotrebe hemiskih sredstava, te se na taj način dobija pogača sa proteinima u nativnom stanju i sačuvanim bioaktivnim komponentama (Pojić i sar., 2018; Rabrenović i sar., 2014). Za razliku od toga, uljana pogača koja zaostaje nakon industrijske proizvodnje ulja u svom sastavu sadrži organski rastvarač koji se koristi za efikasnije izdvajanje ulja. Njegovo uklanjanje zahteva zagrevanje pogače pri čemu dolazi do denaturisanja proteina, što se negativno odražava na prinos proteina prilikom ekstrakcije, kao i na njihove fizičko-hemijske osobine (Day, 2013; Pojić i sar., 2018).

Komercijalno, biljni proteini se izdvajaju iz uljanih pogača postupkom rastvaranja proteina koji se zatim precipituju u izoelektričnoj tački. U zavisnosti od medijuma koji se

koristi u procesu rastvaranja, dobija se nekoliko proteinskih proizvoda (Moure i sar., 2006; Pojić i sar., 2018):

- proteinsko brašno ili proteinski koncentrat sa sadržajem proteina do 60% ili 60–90%, respektivno – kada se koristi neutralni ili kiseli medijum;
- proteinski izolat sa sadržajem proteina iznad 85% – kada se upotrebljava bazni medijum.

Proteinski proizvodi poreklom iz uljarica (soje, uljane repice) su već decenijama dostupni na tržištu. Međutim, njihova potrošnja je daleko ispod očekivane, prvenstveno zbog otpora prema genetski modifikovanoj hrani sa kojom se povezuje soja, ali i zbog činjenice da se uljarice ubrajaju među najveće alergene, gde soja, kikiriki i koštuničavo voće čine tri od četiri najveća biljna alergena. Stoga, alternativni biljni izvori proteina koji ne izazivaju alergijske reakcije postaju sve značajniji (Alves i Tavares, 2019; Berton-Carabin i Schroën, 2019; Burger i Zhang, 2019; Fasolin i sar., 2019; Jeske i sar., 2018).

2.3.3. MOLEKULARNE OSOBINE PROTEINA SEMENA TIKVE (*Cucurbita Pepo*)

Jedan od alternativnih izvora biljnih proteina predstavlja i seme tikve (*Cucurbita pepo*) koje sadrži između 24% i 37% proteina, a koji se u procesu izdvajanja ulja koncentrišu u uljanoj pogači, gde njihov sadržaj može dostići i do 65% (El-Adawy i Taha, 2001; Quanhong i Caili, 2005; Rezig i sar., 2013; Vaštag i sar., 2011). Glavnu proteinsku frakciju semena tikve čini skladišni protein 11S globulin, takozvani kukurbitin, koji je sličan 11/12S globulinima iz leguminoza (Rezig i sar., 2013). Kukurbitin je heksamer sačinjen od šest jednakih podjedinica molekulske mase 54 kDa, čijim sabiranjem se dobija ukupna molekulska masa kukurbitina od oko 325 kDa

(Blagrove i Lilley, 1980; Rezig i sar., 2013). Dvodimenzionalna SDS elektroforeza pokazala je da se svaka podjedinica kukurbitina sastoji od dva disulfidno vezana polipeptidna lanca, kiselog i baznog, molekulskih masa 33 kDa i 22 kDa, respektivno (Blagrove i Lilley, 1980; Rezig i sar., 2013; Rudakova i sar., 2014). Pored 12S globulinske frakcije, utvrđeno je i prisustvo 18S globulina, u odnosu 12S:18S=9:1, koji su zapravo, dimer 12S komponenata (Blagrove i Lilley, 1980). Rastvorljivost kukurbitina se kreće od 60% do 95% u zavisnosti od pH vrednosti sredine, osim u izoelektričnoj tački, na pH 4,5–7, gde je praktično nerastvorljiv (rastvorljivost manja od 0,5%). Pored sposobnosti stabilizovanja pena, emulgovanjem ulja u rastvoru kukurbitina utvrđeno je da kukurbitin ima i emulgujuće osobine (Popović i sar., 2013). Enzimskom hidrolizom kukurbitina dobijaju se proteinski hidrolizati sa poboljšanim funkcionalnim osobinama, pre svega sa smanjenom zavisnošću rastvorljivosti od pH vrednosti i povećanom antioksidativnom aktivnošću (Peričin i sar., 2008; Popović i sar., 2013).

Među proteinima semena tikve se, pored globulina, u znatno manjim količinama mogu naći i albumini, pri čemu ove dve frakcije zajedno čine 59% od ukupno prisutnih proteina (Fruhworth i Hermetter, 2007; Marcone i sar., 1998). 2S albumin je heterodimer molekulske mase 12,5 kDa, koji se sastoji od dva disulfidno vezana polipeptidna lanca, manjeg, čija molekulska masa iznosi 4,8 kDa, i većeg, sa molekulskom masom od 7,9 kDa (Fang i sar., 2010; Tomar i sar., 2014).

Aminokiselinski sastav proteina semena tikve prikazan je u tabeli 1. U sastavu proteina semena tikve preovladavaju arginin, glutamat i glutaminska kiselina, dok su metionin, tirozin, histidin i treonin prisutne u niskim koncentracijama (Idouraine i sar., 1996; Pichl, 1976; Rezig i sar., 2013). Uprkos tome, smatra se da proteini semena tikve imaju veoma visok sadržaj esencijalnih aminokiselina koji zadovoljava kriterijume SZO i FAO preporučene za decu od 2–5 godina, sa izuzetkom treonina, lizina i leucina (El-Adawy i Taha, 2001; Rezig i sar., 2013; Yadav i sar., 2010). Pored toga, zabeleženo je i prisustvo retkih aminokiselina poput citrulina, m–karboksifenilalanina, b–pirazoalanina, g–aminobutirne kiseline i etilasparaginske kiseline (Fruhworth i Hermetter, 2007).

Tabela 1. Aminokiselinski sastav proteina izolovanih iz semena tikve (Rezig i sar., 2013)

Aminokiselina	Sadržaj (mg/100g)	Aminokiselina	Sadržaj (mg/100g)
Cys	3,4 – 6,4	Ile	1,9 – 4,9
Met	0,2 – 2,1	Leu	6,7 – 12,2
Thr	2,0 – 3,6	Phe	2,3 – 8,2
Ser	3,1 – 7,4	Tyr	0,4 – 4,3
Glx	18,5 – 27,8	Pro	4,0 – 5,0
Asx	3,2 – 7,3	His	0,3 – 3,0
Gly	4,9 – 6,8	Lys	2,6 – 4,0
Ala	4,0 – 6,9	Arg	18,3 – 23,1
Val	4,0 – 6,7		

Laka dostupnost aminokiselina i digestija proteina od 90%, koje mogu da pariraju proteinima soje, čine proteine semena tikve dobrim izborom za formulisanje funkcionalne i nutritivno bogate hrane (El-Adawy i Taha, 2001; Rezig i sar., 2013). U prilog tome ide i činjenica da proteini semena tikve poseduju biološku aktivnost od kojih se izdvaja antidiabetički, antifungalni, antibakterijski i protivupalni efekat, zatim antioksidativna aktivnost, antikancerogeni efekat i pozitivno deljstvo na koagulaciju krvi (Quanhong i Caili, 2005; Rezig i sar., 2013; Tomar i sar., 2014; Yadav i sar., 2010).

2.3.4. ENZIMSKA HIDROLIZA PROTEINA

Većina prehrambenih namirnica ima nisku pH vrednost, blisku izoelektričnoj tački mnogih proteina. U takvim uslovima, funkcionalne osobine proteina su daleko od optimalnih pa se proteini podvrgavaju fizičkim, hemijskim ili biološkim modifikacijama ne bi li se poboljšale njihove funkcionalne karakteristike (Panyam i Kilara, 1996).

Enzimaska hidroliza je bioproces u kome se modifikuju funkcionalne osobine proteina bez ugrožavanja njihove nutritivne vrednosti (Chabanon i sar., 2007; Jamdar i sar., 2010; Wu i sar., 2019). Prednosti enzimske hidrolize nad drugim procesima modifikacije proteina, fizičkim ili hemijskim, su blagi procesni uslovi, visoka specifičnost reakcije, izbegavanje hemijskih agenasa i minimalno formiranje sporednih proizvoda (Mokni Ghribi i sar., 2015; Sun, 2011; Tavano, 2013; Wu i sar., 2019; Yust i sar., 2010). Enzimaska hidroliza spada u zelene tehnologije što je izdvaja u odnosu na druge tipove modifikacija proteina (Wu i sar., 2019).

Enzimskom hidrolizom dolazi do hidrolitičkog raskidanja peptidnih veza između dve amino kiseline u lancu proteina ili peptida u prisustvu enzima – proteaza / proteinaza, slika 12 (dos Santos Aguilar i Sato, 2018; Nnanna i Xia, 2001).

Osobine hidrolizata zavise od njihove molekulske mase, strukture i sekvence amino kiselina. Jedan od osnovnih parametara kojim se opisuje proces i produkti hidrolize, kao i osobine dobijenog hidrolizata je stepen hidrolize (*SH*), koji predstavlja procenat raskinutih peptidnih veza (Chabanon i sar., 2007; Jamdar i sar., 2010).

SH se određuje indirektno, na osnovu količine baze koja je potrebna za održavanje konstantne pH vrednosti u toku hidrolize – „pH stat“ metoda; na osnovu snižavanja tačke zamrzavanja – osmometrijska metoda; na osnovu povećanja rastvorljivosti u trihlorsirćetnoj kiselini – TCA metoda; ili na osnovu reakcije sa trinitrobenzen-sulfonskom kiselinom – TNBS metoda. Nedostatak korišćenja nabrojanih metoda je što *SH* određeni različitim metodama često nisu uporedivi (Nnanna i Xia, 2001; Panyam i Kilara, 1996).



Slika 12. Proteolitička reakcija katalizovana proteazom (P_1 i P_2 – polipeptidi; R_1 i R_2 – aminokiselinske rezidue) (Nnanna i Xia, 2001)

Čak i hidrolizati sa istim *SH*, određenim jednom metodom, koji potiču od istog supstrata, ali su dobijeni hidrolizom različitim enzimima, mogu imati različitu distribuciju molekulskih masa (Nnanna i Xia, 2001). Uopšteno važi pravilo da što je *SH* veći to su dimenzije peptida manje. Međutim, *SH* zapravo ne daje informacije o odnosu hidrolizata i nehidrolizovanih proteina, niti o tipu peptida koji čine hidrolizat (Lacou i sar., 2016).

Uprkos tome, *SH* se i dalje najčešće koristi za opisivanje hidrolizata, te se na osnovu *SH* proteinski hidrolizati kategorizuju u tri grupe koje bliže određuju njihovu upotrebu (Miñones Conde i Rodríguez Patino, 2007; Rodríguez Patino i sar., 2007; Popović i sar., 2013, Vaštag i sar., 2011):

- hidrolizati sa niskim *SH*, kod kojih su poboljšane određene funkcionalne osobine (uglavnom rastvorljivost, kapacitet stvaranja pene i emulzioni kapacitet);
- hidrolizati sa variabilnim *SH* koji se koriste kao arome;
- hidrolizati sa visokim *SH* – bioaktivni peptidi, koji se upotrebljavaju kao nutritivni suplementi i sastojci specijalnih medicinskih dijeta.

Pored određivanja *SH* postoji još par metoda kojima se karakterišu hidrolizati. Elektroforeza se koristi za karakterisanje peptida na osnovu molekulske mase putem SDS–PAGE, ili za određivanje naelektrisanja i molekulske mase peptida putem urea–PAGE. Za razdvajanje peptida po veličinama ili na osnovu naelektrisanja koriste se ekskluziona ili jono–izmenjivačka hromatografija, respektivno, a masena spektrometrija služi za određivanje masenog profila peptida u hidrolizatu i identifikaciju pojedinih peptida i odgovarajućeg proteina od kojeg su dati peptidi nastali. Da bi se dobile preciznije informacije o fizičkim karakteristikama enzimskih hidrolizata neophodno je primeniti kombinaciju spomenutih metoda (Lacou i sar., 2016).

2.3.3.1. Emulziona i adsorpciona svojstva proteinskih hidrolizata

Enzimsku hidrolizu proteina prate tri efekta: I) smanjenje molekulske mase; II) povećanje broja jonizujućih grupa; III) otkrivanje hidrofobnih grupa koje su prethodno bile sakrivene unutar proteinske strukture (Nnanna i Xia, 2001). Promene u funkcionalnim osobinama proteina su direktna posledica ovih efekata (Tamm i Drusch, 2017; Van der Ven i sar., 2001; Wu i sar., 2019).

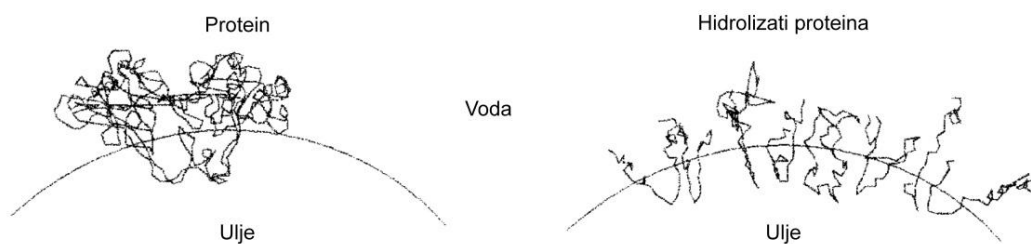
Povećanjem broja jonizujućih grupa i smanjenjem molekulske mase dolazi do promene konformacije i strukture proteina čime je prvenstveno poboljšana rastvorljivost proteina pri različitoj pH vrednosti ili temperaturi sredine (Rodríguez Patino i sar., 2007; Tavano, 2013; Wu i sar., 2019; Zhao i sar., 2011). Rastvorljivost raste sa povećanjem *SH*, međutim, enzimsku hidrolizu sa *SH* hidrolize se može negativno odraziti na ostale funkcionalne osobine proteina (Lacou i sar., 2016). Naime, otkrivanje nedostupnih hidrofobnih grupa i smanjenje molekulske mase pospešuju afinitet hidrolizata prema granici faza u sistemu ulja i vode do određenog *SH*. Nakon toga, daljom enzimskom hidrolizom visoka koncentracija hidrolizovanih proteina se zadržava u kontinualnoj fazi, usled smanjenog afiniteta prema granici faza (Lam i Nickerson, 2013).

Teoretski, kontrolisanom enzimskom hidrolizom dobiju se hidrolizati sa poboljšanom emulzionim osobinama u odnosu na nativni protein. Poboljšanje emulzionih osobina je posledica tri efekta (Lacou i sar., 2016):

- I poboljšana adsorpcija na granicu faza;
- II otkrivanja hidrofobnih delova koji su prethodno bili sakriveni unutar strukture proteina, usled čega njihova adsorpcija u nepolarnu fazu ne zahteva denaturaciju proteina razmotavanjem strukture;
- III prisustva sulfhidrilnih, odnosno tiolnih, ($-SH$) grupa na pojedinim peptidima koje omogućavaju formiranje disulfidnih veza kojima se ostvaruju kovalentne veze između različitih peptida i stvara viskoelastični adsorpcioni film.

Manja molekulska masa hidrolizata u odnosu na nativni protein omogućava hidrolizatima veću brzinu difuzije ka granici faza (Davis i sar., 2005; Martínez i sar., 2009; Tamm i sar., 2016). Zatim, enzimski hidrolizati zbog fleksibilnije strukture i manjih dimenzija u odnosu na nativni protein, imaju više mogućnosti da zauzmu odgovarajući položaj na granici faza tako da se njihove hidrofobne grupe adsorbuju u nepolarnu fazu. Površina granice faza koju hidrolizati mogu da zauzmu je veća od površine koju zauzima nativni protein, slika 13, što obično za posledicu ima poboljšanje emulzionih svojstva (Adjonu i sar., 2014a; Nnanna i Xia, 2001; Wu i sar., 2019).

Površinska aktivnost segmenata proteinskog landa dobijenih enzimskom hidrolizom se razlikuje od segmenta do segmenta u zavisnosti od njihove veličine i sekvence amino kiselina (Nnanna i Xia, 2001). Hidrolizati različitog *SH* se međusobno razlikuju, po ravnotežnom međupovršinskom naponu kao i po brzini dostizanja određenog međupovršinskog naponu, što pored same dužine peptidnog lanca zavisi i od odnosa hidrofilnih i hidrofobnih grupa u peptidnim lancima hidrolizata (Rodríguez Patino i sar., 2007; Schröder i sar., 2017; Tamm i sar., 2016).



Slika 13. Distribucija delimično razmotanog proteinskog molekula i njegovih hidrolizata na granici faza ulja i vode (Nnanna i Xia, 2001)

Smanjenje molekulske mase proteina/peptida usled enzimske hidrolize se može negativno odraziti na stabilnost koloida. Naime, peptidi male molekulske mase nisu u mogućnosti da se nakon adsorbovanja na granicu faza dovoljno „ispruže“ u kontinualnu fazu ne bi li obezbedili sterno odbijanje (Nnanna i Xia, 2001). Hidrolizati male molekulske mase imaju manju sposobnost interakcije na granici faza, te formiraju adsorpcione filmove smanjene viskoelastičnosti čime se narušava stabilnost emulzija (Martínez i sar., 2007). Peptidni lanci molekulske mase veće od 5 kDa su neophodni da bi se sprečila koalescencija emulzija (Schröder i sar., 2017).

Najbolje funkcionalne osobine hidrolizata se dobijaju kontrolisanom i limitiranom enzimskom hidrolizom proteina u kojoj se dobijaju hidrolizati sa relativno malim *SH* (dos Santos Aguilar i Sato, 2018; Rodriguez Patino i Pilosof, 2011). Među biljne proteine čije su emulzione i adsorpcione osobine korigovane primenom enzimske hidrolize ubrajaju se proteini kikirikija (Jamdar i sar., 2010; Radha i sar., 2008; Zhao i sar., 2011), leblebije (Mokni Ghribi i sar., 2015; Yust i sar., 2010), sočiva (Avramenko i sar., 2013), krompira (Cheng i sar., 2010), repice (Chabanon i sar., 2007), soje (Radha i sar., 2008; Tsumura i sar., 2005; Yuan i sar., 2012), susama (Chatterjee i sar., 2015; Radha i sar., 2008), suncokreta (Miñones Conde i Rodríguez Patino, 2007; Rodríguez Patino i sar., 2007), amaranta (engl. *amaranth*) (Ventureira i sar., 2010, 2012), crnog mungo pasulja (eng. *Indian black gram*) (Wani i sar., 2015), graška (Tamm i sar., 2016), pšenice (Joye i McClements, 2014), kokosa (Thaiphanit i sar., 2016) i mnogih drugih biljaka.

2.3.3.2. Enzimski hidrolizati proteina semena tikve (Cucurbita pepo)

Enzimska hidroliza proteina semena tikve je ispitivana upotrebom nekoliko enzima: pepsina, flavourzima, alkalaze, protameksa i neutraze. Tok enzimske hidrolize proteina semena tikve pepsinom u zavisnosti od jonske jačine i koncentracije enzima je optimizovan računarskom modelovanjem (Peričin i sar., 2009; Živanović i sar., 2011). Enzimska hidroliza globulina semena tikve, kukurbitina, alkalazom, flavourzimom i pepsinom pokazala je da alkalaza hidrolizuje najviše peptidnih veza na molekulu

kukurbitina dok se upotrebom flavorzima može dobiti hidrolizat kukurbitina sa stepenom hidrolize ne većim od 9%. U sva tri slučaja, enzimska hidroliza je poboljšala rastvorljivost kukurbitina, u zavisnosti od stepena hidrolize, ali je daleko najveće povećanje rastvorljivosti kukurbitina u izoelektričnoj tački ostvareno hidrolizom pepsinom. Upotrebom bilo kojeg od tri ispitivana enzima emulziona svojstva enzimskih hidrolizata kukurbitina su poboljšana u odnosu na enzimska svojstva nehidrolizovanog kukurbitina pri stepenu hidrolize nižem od 15% (Popović i sar., 2013).

Pored ispitivanja funkcionalnih osobina hidrolizata kukurbitina, zabeležen je i porast antioksidativne aktivnosti njegovih hidrolizata, kao i antioksidativne aktivnosti hidrolizata proteinskog izolata semena tikve (Vaštag i sar., 2010).

Enzimska hidroliza alkalazom, flavorzimom, protameksom i neutrazom primenjiva je i na uljanoj pogači semena tikve, pri čemu se povećava prinos proteinskog izolata (Venuste i sar., 2013). Aminokiselinski sastav hidrolizata je u skladu sa zahtevima WHO i FAO po pitanju esencijalnih aminokiselina. Pored toga, enzimskom hidrolizom se povećava digestija proteina semena tikve sa 71,32% na 77,96%. Alkalaza se pokazala kao najpovoljnija za proizvodnju hidrolizata proteina semena tikve sa poboljšanim nutritivnim kvalitetom, dok flavorzim najpovoljniji za proizvodnju hidrolizata proteina semena tikve sa poboljšanom antioksidativnom aktivnošću.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

U eksperimentalnom radu u okviru ove disertacije korišćeni su sledeći materijali:

- Uljana pogača semena tikve (*Cucurbita pepo*). Uljana pogača tikve je sekundarni proizvod koji zaostaje nakon izdvajanja ulja iz semena tikve postupkom hladnog ceđenja – „Agrojapra“, Bosna i Hercegovina;
- Jestivo rafinisano ulje suncokreta – „Vital“, Srbija;
- Trigliceridi srednje dužine lanca, kaprilni/kaprinski trigliceridi – „Centrohem“, Srbija;
- Alkalaza – proteaze iz *Bacillus lichenioformis*, tečna, deklarirana aktivnost 2,4 AU/g (Anson Unit/g) – „Sigma–Aldrich“, SAD;
- Pepsin, liofilizirani prah, deklarirana aktivnost 0,7 FIP–U/mg (Federation Internationale Pharmaceutique units/mg) – „Sigma–Aldrich“, SAD;
- Di–natrijum hidrogenfosfat anhidrovani ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), čistoća >98 % – „Centrohem“, Srbija;
- Limunska kiselina ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), čistoća $\geq 99,5$ % – „Centrohem“, Srbija;
- Natrijum hidroksid (NaOH), čistoća ≥ 98 % – „Centrohem“, Srbija;
- Hlorovodonična kiselina (HCl) 36 %, – „Centrohem“, Srbija;
- Natrijum hlorid (NaCl), čistoća >99,5 % – „Centrohem“, Srbija;
- n–Heksan (C_6H_{14}), čistoća >96 % – „Centrohem“, Srbija;
- Glicin ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), čistoća >99 % – „Centrohem“, Srbija;

- Trihlorsirćetna kiselina (Cl_3CCOOH), čistoća >99 % – „Centrohem“, Srbija;
- Albumin iz kravljeg mleka, čistoća $\geq 98\%$ – „Merck“, Nemačka;
- Akrilamid/bisakrilamid, 30% rastvor, maseni odnos akrilamid:bisakrilamid=37,5:1 – „Sigma Aldrich“, SAD;
- Tris baza (Tris(hidroksimetil)amino metan, $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$), čistoće $\geq 99,8\%$ – „Thermo Fisher Scientific“, SAD;
- Natrijum dodecil–sulfat (SDS), čistoća >99 % – „Merck“, Nemačka;
- β –merkaptioetanol, čistoća $\geq 99\%$ – „Sigma Aldrich“, SAD;
- Coomassie brilliant blue R–250 – „Thermo Fisher Scientific“, SAD;
- Sirćetna kiselina glacijalna (CH_3COOH) čistoća $\geq 99,8\%$ – „Centrohem“, Srbija;
- Metanol (CH_3OH), čistoća 99,8 %, – „Centrohem“, Srbija;
- Demineralizovana voda
- Ultrapure MilliQ voda

Puferi određene pH vrednosti su pripremljeni mešanjem potrebnih zapremina $0,2 \text{ mol/dm}^3$ rastvora di–natrijum hidrogenfosfata i $0,1 \text{ mol/dm}^3$ rastvora limunske kiseline.

3.2. METODE

3.2.1. PRIPREMA IZOLATA PROTEINA SEMENA TIKVE

Pre upotrebe uljana pogača je čuvana na temperaturi od 4 °C a zatim usitnjena mlinom za kafu.

Izolat proteina semena tikve (IPST) se izdvaja iz uljane pogače tikve u postupku alkalne ekstrakcije sa precipitacijom u izoelektričnoj tački. Naime, 300 g usitnjene uljane pogače je najpre dva puta obezmašćeno sa po 1,5 l heksana. Obezmašćena uljana pogača je osušena na sobnoj temperaturi, a zatim je 200g osušene obezmašćene uljane pogače dispergovano u 500 ml demineralizovane vode. Zatim, pH vodene disperzije uljane pogače je podešen dodatkom 1 mol/dm³ osnovnog rasvora NaOH do postizanja pH=10. Dispergovana uljana pogača je blago mešana u toku 30 minuta da bi došlo do rastvaranja proteina, nakon čega je suspenzija filtrirana pomoću kvalitativnog filter papira. Rastvoreni proteini u filtratu su istaloženi dodatkom 1 mol/dm³ HCl do postizanja pH=5. Precipitat je izdvojen iz tečne faze centrifugiranjem (Sorvall™ RC 5B centrifuga, Thermo Fisher Scientific, SAD) na 4 °C i 10 000 o/min u trajanju od 20 minuta, zatim sušen na sobnoj temperaturi 48 sati i na kraju, usitnjen mlinom za kafu da bi se dobio IPST u prahu.

3.2.2. ENZIMSKA HIDROLIZA

IPST je enzimski hidrolizovan pomoću alkalaze i pepsina, pri čemu su dobijena dva hidrolizata, H1 i H2, respektivno.

Priprema hidrolizata H1: IPST suspenzija koncentracije 8 g/dm^3 je dobijena suspendovanjem potrebne mase IPST u $0,2 \text{ mol/dm}^3$ glicin-HCl puferu na pH 8. Tako dobijen supstrat je zagrejan do $50 \text{ }^\circ\text{C}$ nakon čega mu je dodata alkalaza u odnosu enzima i substrata $0,5 \text{ cm}^3$ tečne alkalaze po 1 g supstrata. Enzimaska reakcija je zaustavljena nakon 30 min zagrevanjem suspenzije na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ u toku 10 min .

Priprema hidrolizata H2: IPST suspenzija koncentracije 10 g/dm^3 je dobijena suspendovanjem potrebne mase IPST u vodenom rastvoru HCl na pH=3, pri čemu je pH rastvora podešavan i održavan dodavanjem 1 mol/dm^3 osnovnog rastvora HCl u vodu. Tako dobijen supstrat je zagrejan na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ nakon čega mu je dodat pepsin u odnosu enzima i substrata od $0,02 \text{ g}$ praha pepsina po 1 g supstrata. Reakcioni uslovi enzimske hidrolize pepsinom postavljeni su tako da je enzimska hidroliza završena autoinaktivacijom pepsina nakon 90 min .

Stepen hidrolize, *SH*, oba hidrolizata, H1 i H2, iznosio je $19 \pm 1 \%$.

Po završetku enzimske hidrolize hidrolizovane suspenzije su ohlađene na sobnu temperaturu u vodenom kupatilu ($\approx 25 \text{ }^\circ\text{C}$), filtrirane uz pomoć vakuuma, a filtrati osušeni raspršivanjem u struji vrelog vazduha, „Büchi 190“, (BÜCHI Labortechnik AG, Švajcarska) pri ulaznoj i izlaznoj temperaturi od $120 \text{ }^\circ\text{C}$ i $70 \text{ }^\circ\text{C}$, respektivno, prilikom čega su dobijeni hidrolizati H1 i H2 u praškastom obliku.

3.2.3. ODREĐIVANJE STEPENA HIDROLIZE

U cilju određivanja *SH* hidrolizovana suspenzija IPST je dodata trihlorsirćetnoj kiselini ($0,44 \text{ mol/dm}^3$) u zapreminskom odnosu 1:1. Smeša hidrolizovane suspenzije i trihlorsirćetne kiseline je inkubirana na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ u toku 30 min , a zatim centrifugirana 10 min na 14500 o/min (Eppendorf mini Spin Plus, Eppendorf, Nemačka) da bi se uklonili istaloženi proteini. Supernatant je dekantovanjem odvajen od taloga istaloženih proteina, pri čemu je dobijen rastvor proteina u $0,22 \text{ mol/dm}^3$ trihlorsirćetnoj kiselini koji se dalje koristi za određivanje sadržaja proteina metodom po *Lowry*-ju (Lowry, Rosebrough,

Fair, Randall, 1951) koristeći albimin iz kravljeg mleka kao standardni protein. Uporedo se, primenom iste metode, određuje i sadržaj ukupnih proteina u hidrolizovanoj suspenziji IPST. SH se računa iz odnosa proteina rastvorenih u $0,22 \text{ mol/dm}^3$ trihlorsirćetnoj kiselini i ukupnih proteina u hidrolizatu i izražava se u procentima.

3.2.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA VLAGE, PEPELA I PROTEINA

Sadržaj vlage, pepela i proteina u IPST, H1 i H2 je određen standardnim metodama AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 2000). Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost od najmanje tri rezultata određivanja.

3.2.5. ODREĐIVANJE PRINOSA PROTEINA

Prinos proteina, P , u uzorcima IPST, H1 i H2 predstavlja masu izolovanih proteina u odnosu na masu proteina u početnom materijalu, uljanoj pogači semena tikve, i računa prema jednačini (11):

$$P(\%) = \frac{m^* c_p}{c_{UP}} \quad (11)$$

gde m predstavlja masu IPST, H1 ili H2 dobijenu iz 100 g uljane pogače, c_p predstavlja procentni udeo proteina u IPST, H1 ili H2, a c_{UP} predstavlja procentni udeo proteina u uljanoj pogači semena tikve ($c_{UP} = 63,5\%$).

3.2.6. NATRIJUM–DODECILSULFAT POLIAKRILAMID GEL ELEKTROFOREZA (SDS–PAGE)

Natrijum–dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza je izvedena po metodi Laemmli (1970). Korišćen je 4% (w/v) akrilamidni gel za uzorke i 12% akrilamidni separacioni gel. Gelovi su pripremljeni korišćenjem 30% rastvora akrilamid/bisakrilamid (maseni odnos 37,5/1). Analizirani su rastvori koncentracije 0,1 g/100 cm³ IPST, H1 i H2 u vodenom rastvoru koji sadrži 0,063 mol tris/glicin pufera (pH=6,8), 20 g natrijum dodecil–sulfata i 50 g β–merkaptetanola u 100 cm³ rastvora. Elektroforeza je izvedena na aparaturi Pharmacia LKB – Multi Drive XL (Pharmacia, Švedska), na 60 mA, u vremenu potrebnom da uzorci stignu do gornje ivice gela. Gelovi su nakon elektroforeze obojeni vodenim rastvorom koji sadrži 0,2 g Coomassie brilliant blue R–250, 10 cm³ sirćetne kiseline i 50 cm³ metanola u 100 cm³ rastvora u toku 1 sata i potom potopljeni u vodeni rastvor koji sadrži 10 cm³ sirćetne kiseline i 40 cm³ metanola u 100 cm³ rastvora u trajanju od 16 sati radi obezbojavanja gela i jasnog oslikavanja proteina pri određenoj molekulskoj masi.

3.2.7. PRIPREMA RASTVORA PROTEINA

Suspenzije IPST, H1 i H2 različitih koncentracija ($c_{susp}=1–10$ g/100 cm³) su pripremljene dispergovanjem potrebne mase proteinskog praha u puferu određene pH vrednosti (3–8) i jonske jačine (0–1 mol/dm³ NaCl). Suspenzije su zatim postavljene u vodeno kupatilo na 50 °C uz blago mešanje propelerskom mešalicom u trajanju od jednog sata radi pospešivanja rastvaranja proteina. Rastvori IPST, H1 ili H2 su dobijeni nakon izdvajanja nerastvorenih čestica membranskom filtracijom, korićenjem acetat–celulozne membrane sa nominalnim prečnikom pora 0,45 μm (Sartorius, Nemačka). Koncentracija rastvora proteina je podešavana razblaživanjem dobijenih rastvora odgovarajućim puferima.

3.2.8. ODREĐIVANJE RASTVORLJIVOSTI IPST, H1 I H2

Koncentracija proteina u rastvorima IPST, H1 i H2, c , je određena metodom po Lowry–ju (Lowry, A.H., Rosebrough, N.J., Fair, A.L., Randall, 1951) pomoću UV–VIS double beam HALO DB–20S spektrofotometra (Dynamica Scientific Ltd., Velika Britanija) i izražena u $\text{g}/100 \text{ cm}^3$. Rastvorljivost, s , IPST, H1 i H2 je računata po formuli (12):

$$s = \frac{c * 100}{c_{susp}} \quad (12)$$

Ukupan doprinos rastvorljivosti, Δs , predstavlja povećanje odnosno smanjenje rastvorljivosti proteina prilikom povećanja jonske jačine sa $0 \text{ mol}/\text{dm}^3 \text{ NaCl}$ na $1 \text{ mol}/\text{dm}^3 \text{ NaCl}$ i određen je korišćenjem jednačine:

$$\Delta s = (s_0 - s_1) * 100 / s_0 \quad (13)$$

gde s_0 ($\text{g}/100 \text{ cm}^3$) predstavlja rastvorljivost proteina kada je $I_c = 0 \text{ mol}/\text{dm}^3 \text{ NaCl}$, dok s_1 ($\text{g}/100 \text{ cm}^3$) označava rastvorljivost proteina kada je $I_c = 1 \text{ mol}/\text{dm}^3 \text{ NaCl}$.

3.2.9. MERENJE ZETA POTENCIJALA

Rastvori proteina za merenje zeta potencija su pripremljeni suspendovanjem potrebne mase IPST, H1 ili H2 u demineralizovanoj vodi tako da se rastvaranjem dobije rastvor proteina u koncentraciji od $\approx 1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$. pH suspenzije (3 do 8) je podešen dodatkom $0,1 \text{ mol}/\text{dm}^3 \text{ NaOH}$ ili $0,1 \text{ mol}/\text{dm}^3 \text{ HCl}$, nakon čega je suspenzija zagrejana pomoću vodenog kupatila na $50 \text{ }^\circ\text{C}$ uz blago mešanje u toku jednog sata u cilju pospešivanja rastvaranja proteina. Nakon isteka jednog sata, pH suspenzije je ponovo

izmeren i, po potrebi, naknadno podešavan do željene pH. Nerastvorene čestice suspenzije su odvojene od proteinskog rastvora, tj. rastvora IPST, H1 ili H2, filtriranjem na Sartorius membranskom filtru (prečnik pora 0,45 μm) (Sartorius, Nemačka). Zeta potencijal rastvorenih proteina IPST, H1 i H2, koncentracije 1 g/100 cm^3 , je određen na Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Velika Britanija), tako što je najpre izmerena elektroforetska pokretljivost rastvorenih proteina, preko koje je izračunat zeta potencijal. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost bar tri merenja.

3.2.10. ODREĐIVANJE POVRŠINSKOG I MEĐUPOVRŠINSKOG NAPONA/PRITISKA

Površinski napon vazduh/rastvor proteina i međupovršinski napon ulje/rastvor proteina izmereni su metodom Du Noüy–jevog prstena pomoću tenziometra Sigma 703D (KSV Instruments LTD, Finska) na temperaturi od 25 °C. Prsten je najpre uronjen u 20 ml rastvora IPST, H1 ili H2 koncentracije 0,1 g/100 cm^3 . U slučaju merenja međupovršinskog napona, na površinu rastvora proteina pažljivo se dodaje 20 ml suncokretovog ulja. Formirane granice faza vazduh/rastvor proteina ili ulje/rastvor proteina se ostavljaju u mirovanju sledećih 10 min radi uravnotežavanja granične površine nakon čega sledi merenje površinskog ili međupovršinskog napona. Površinski napon pufera iznosio je $71,7 \pm 0,4$ mN/m bez obzira na pH vrednost. Međupovršinski napon pufera na pH 3–7 iznosio je $28,4 \pm 0,9$ mN/m, dok je na pH 8 izmerena vrednost međupovršinskog napona iznosila $25,7 \pm 1$ mN/m. Izmerene vrednosti površinskog i međupovršinskog napona proteinskih rastvora su upotrebljene za izračunavanje površinskog, $\pi_{\text{vazduh/rastvor}}$, i međupovršinskog pritiska, $\pi_{\text{ulje/rastvor}}$, po sledećoj formuli (14):

$$\pi = \sigma_0 - \sigma \quad (14)$$

gde je σ_0 površinski/međupovršinski napon pufera a σ površinski/međupovršinski napon rastvora IPST, H1 i H2.

3.2.11. ODREĐIVANJE DINAMIČKOG MEĐUPOVRŠINSKOG NAPONA I REOLOŠKIH OSOBINA PROTEINSKIH ADSORPCIONIH FILMOVA

Dinamički međupovršinski napon ulje/rastvor proteina je određen metodom analize profila viseće kapi na tenziometru PAT1 (Sinterface Technologies, Nemačka). Međupovršinski napon sveže formirane kapi ulja u rastvoru proteina praćen je u funkciji vremena, u toku narednih 60 min na sobnoj temperaturi (24 ± 1 °C). Izmerene vrednosti dinamičkog međupovršinskog napona rastvora proteina su upotrebljene za izračunavanje dinamičkog međupovršinskog pritiska, $\pi_{ulje/rastvor}$, korišćenjem jednačine (14) za svaki vremenski interval posebno.

Nakon 60 min od formiranja kapi površina kapi je sinusoidalno narušavana putem naizmeničnog dovođenja i odvođenja definisane zapremine ulja u kap i iz kapi, čime su izazvane dilatacione oscilacije slobodne površine kapi. Adsorbovani proteinski filmovi reološki su karakterisani primenom oscilacije kapi na pet različitih frekvencija, 0,01, 0,02, 0,04, 0,1 i 0,2 Hz pri konstantnoj amplitudi od 10 % u odnosu na zapreminu viseće kapi, uz periode mirovanja u trajanju od 100 s između različitih frekvencija.

3.2.12. ANALIZA KINETIKE ADSORPCIJE

Kinetika adsorpcije proteina na granicu faza je analizirana primenom pojednostavljene forme Ward i Tordai jednačine (15) (Ward i Tordai, 1946):

$$\pi = 2ck_b T (Dt / 3,14)^{1/2} \quad (15)$$

čiji nagib linearne oblasti na grafičkom prikazu predstavlja konstantu brzine difuzije, k_{dif} (Jarpa-Parra i sar., 2015; Rodríguez Niño i sar., 2005; Ruíz-Henestrosa i sar., 2009; Tang i Shen, 2015). Sledeća faze adsorpcije je kvantifikovati primenom jednačine prvog reda:

$$\ln((\pi_{3600} - \pi_t)/(\pi_{3600} - \pi_{400})) = -k_i t \quad (16)$$

gde su π_{3600} , π_t i π_{400} međupovršinski pritisci nakon 3600 s, nakon vremena t , i u inicijalnom vremenu, respektivno, a k_i predstavlja konstantu brzine prvog reda. Grafički prikaz ove jednačine obično ima dva ili više linearnih regiona (Jarpa-Parra i sar., 2015; Rodríguez Niño i sar., 2005; Ruíz-Henestrosa i sar., 2009; Tang i Shen, 2015). U okviru ove disertacije analiziran je prvi linearan region radi dobijanja konstante brzine adsorpcije, k_{ads} , koja odgovara brzini prodiranja proteinskih molekula na granicu faza i otvaranju njihove strukture. Drugi linearni region koji predstavlja naknadno prilagođavanje proteinske strukture granici faza nije obuhvaćen analizom zbog činjenice da je adsorpcija proteina na granicu faza tečno–tečno dugotrajan i vremenski zahtevan proces.

3.2.13. PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA EMULZIJA

20% (w/w) emulzije ulja u vodi su pripremljene dispergovanjem 6 g suncokretovog ulja u 24 g kontinualne faze na homogenizeru Ultraturrax T–25 (Janke&Kunkel, Nemačka) na 25 °C, pri 10000 o/min u toku 10 min. Kao kontinualna faza korišćeni su rastvori IPST, H1 ili H2 u koncentraciji od 0,1 g/100 cm³ ili 1 g/100 cm³, određene vrednosti pH (3, 5 ili 8) i jonske jačine (0 ili 0,5 mol/dm³ NaCl).

Ispitivanje uticaja broja obrtaja turbine homogenizera prilikom pripreme emulzije i uticaja sastava kontinualne faze na prosečan prečnik kapljica emulzije korišćene su sledeće kontinualne faze: I) IPST na pH 8, II) H1 na pH 5, III) H1 na pH 8 i IV) H2 na

pH 3. Jonska jačina kontinualnih faza iznosila je $0,5 \text{ mol/dm}^3$ NaCl. Pripremljene su 20 U/V emulzije dispergovanjem 6 g suncokretovog ulja u 24 g kontinualne faze na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ u toku 10 min prema sledećim procedurama:

- E10 – homogenizacija na 10000 o/min, koncentracija proteina u kontinualnoj fazi $c = 1 \text{ g/100 cm}^3$;
- E24 – homogenizacija na 24000 o/min, koncentracija proteina u kontinualnoj fazi $c = 1 \text{ g/100 cm}^3$;
- E1,5 – homogenizacija na 24000 o/min, koncentracija proteina u kontinualnoj fazi $c = 1,5 \text{ g/100 cm}^3$;
- SUSP – homogenizacija na 24000 o/min, koncentracija proteina u kontinualnoj fazi koju čini suspenzija proteina $c_{susp} = 1 \text{ g/100 cm}^3$;

Zapreminski prosečan prečnik kapljica emulzije određen je metodom difrakcije laserskog zraka upotrebom Mastersizer Micro Particle Analyzer (Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija). Pufferi odgovarajućeg pH i jonske jačine korišćeni su za snimanje baznog spektra. Parametri koji su korišćeni tokom određivanja su: refraktivni indeks pufera, kao kontinualne faze, 1,33; refraktivni indeks suncokretovog ulja – disperzne faze 1,469; absorbanca uzoraka 0,1. Emulzije su ukapavane u kivetu do postizanja obskuracije između 10 i 20%. Prikazane vrednosti zapreminskog prosečnog prečnika, $d_{3,0}$ predstavljaju srednju vrednost najmanje tri merenja.

Prosečan prečnik kapljica emulzija pripremljenih po procedurama E10, E24, E1,5 i SUSP je određen mikrofotografskom analizom, s obzirom da s emulzije pripremljene po SUSP proceduri sadržavale nerastvorene čestice proteina koje smetaju određivanju prosečnog prečnika na Mastersizer Micro Particle Analyzer–u. Mikrofotografije emulzija su fotografisane pomoću optičkog mikroskopa – Bel 3000 (Bioptica, Italija) sa kamerom

BEL® photonics i softverom BelView7. Veličina i raspodela veličina kapljica na mikrofotografijama određena je pomoću Leica Qwin softvera. Brojčani prosečan prečnik, d_{10} , i standardna devijacija, σ_x su izračunati po sledećim formulama:

$$d_{10} = \frac{\sum_{i=1}^n D_i}{n} \quad (17)$$

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\left(\sum_{i=1}^n D_i - d_{10}\right)^2}{n}} \quad (18)$$

gde je D_i prečnik svake kapi a n predstavlja ukupan broj izmerenih kapi ($n > 1000$).

3.2.14. STABILNOST EMULZIJA

Stabilnost emulzija je praćena putem kriming testa. Naime, emulzije su odmah nakon pripreme sipane u staklene graduisane cilindre od 10 ml gde je njihova stabilnost praćena tokom 14 dana. Tokom tog perioda, u gornjem delu emulzija se izdvaja sloj krema bogat emulgovanim kapljicama, a u donjem delu sloj seruma bogat kontinualnom fazom. Promene u stabilnosti emulzija su praćene vizualno i karakterisane su putem kriming indeksa, KI , koji se računa po formuli (19):

$$KI(\%) = \frac{V_S * 100}{V_E} \quad (19)$$

gde je V_S zapremina seruma a V_E predstavlja ukupnu zapreminu emulzije.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. SADRŽAJ PROTEINA, PEPELA I VLAGE

Sadržaj proteina, pepela i vlage u proteinskom izolatu i hidrolizatima semena tikve su analizirani u cilju dobijanja detaljnijeg uvida u njihov sastav. Rezultati određivanja sadržaja proteina, pepela i vlage u IPST, H1 i H2 prikazani su u Tabeli 2.

Tabela 2. Sadržaj proteina, pepela i vlage u IPST, H1 i H2.

Uzorak	Proteini (%)	Pepeo (%)	Vlaga (%)
IPST	84,87 ± 2,00	2,48 ± 0,01	8,59 ± 0,02
H1	89,39 ± 2,10	5,38 ± 0,03	5,21 ± 0,01
H2	92,13 ± 1,70	2,13 ± 0,04	5,78 ± 0,00

IPST, H1 i H2 imaju visok sadržaj proteina od 84,87%, 89,39% i 92,13%, respektivno, karakterističan za proteinske izolate i hidrolizate. Sličan sadržaj proteina zabeležen je u proteinskim izolatima suncokreta (Pérez i sar., 2005), susama (Achouri i sar., 2012), indijskog oraha (Yuliana i sar., 2014), sočiva (Avramenko i sar., 2013), indijskog crnog pasulja (*Phaseolus mungo* L.) (Wani i sar., 2015), leblebije, boba, ovsenih mekinja, lana, soje i graška (Pojić i sar., 2018) i proteinskim izolatima i hidrolizatima kikirikija (Jamdar i sar., 2010).

Sadržaj pepela u IPST i H2 je približnih vrednosti, 2,48% i 2,13%, respektivno. Pepeo u ova dva uzorka najvećim delom potiče od soli nastalih neutralizacijom kiselina i

baza korišćenih u procesu dobijanja uzoraka (Wani i sar., 2015). Za razliku od procesa pripreme IPST i H2, prilikom pripreme hidrolizata H1 korišćen je 0,2 mol/dm³ glicin–HCl pufer od kojeg potiče viši sadržaj pepela (5,38%), u odnosu na sadržaj pepela u IPST i H2.

Najviši sadržaj vlage od 8,59% je izmeren u IPST, dok je sadržaj vlage hidrolizata H1 i H2 iznosio 5,21% i 5,78%, respektivno. Niži sadržaj vlage u oba hidrolizata, H1 i H2, u poređenju sa IPST se pripisuje različitom načinu pripreme uzoraka, odnosno različitom načinu sušenja uzoraka. Naime, IPST je osušen na sobnoj temperaturi od oko 25 °C, dok su oba hidrolizata osušena u struji vrelog vazduha, na temperaturi od 120 °C.

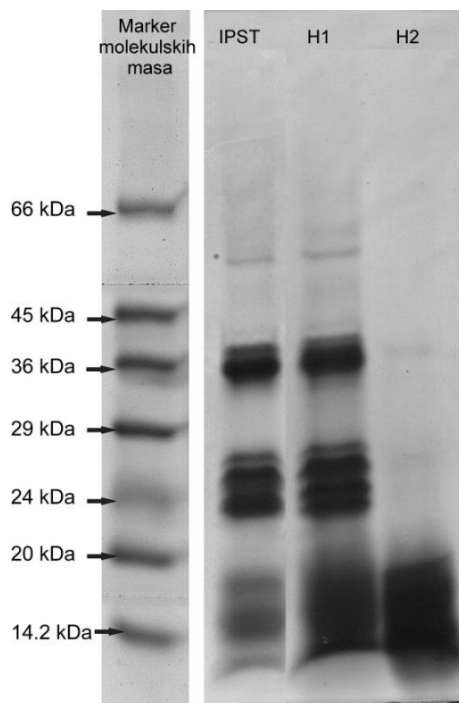
4.2. PRINOS PROTEINA

Prinos proteina u izolatu i hidrolizatima, odnosno maseni udeo izolovanih proteina u odnosu na početni materijal, je važan parametar prilikom evaluacije procesa pripreme proteinskih proizvoda jer ima veliki uticaj na isplativost čitavog postupka. Prinos proteina u IPST, H1 i H2 iznosi: $P_{IPST}=36,5 \pm 0,2\%$, $P_{H1}=19,3 \pm 0,6\%$ i $P_{H2}=15,9 \pm 1,0\%$. Oba hidrolizata, H1 i H2, imaju manji prinos u odnosu na IPST budući da je početni materijal za njihovo dobijanje upravo IPST. Prema tome, rastvorljivost IPST, koja zavisi od uslova pri kojima se odvija hidroliza, je jedan od ograničavajućih faktora prinosa hidrolizata. Šta više, viši prinos H1, koji se hidrolizuje na pH 8, u odnosu na prinos H2, koji se hidrolizuje na pH 3, je rezultat veće rastvorljivosti IPST na pH 8 (detaljnije u poglavlju 4.5.) pri čemu je više proteina dostupno za delovanje enzima na pH 8 u odnosu na pH 3, te se kao krajnji ishod dobija viši prinos hidrolizata H1. Dobijeni rezultati su u skladu sa ranije sprovedenim istraživanjima (Rezig i sar., 2013) koja su ustanovila da prinos proteina u proteinskom izolatu, a samim tim i prinos proteina u hidrolizatima, može biti povećan podešavanjem uslova sredine, pre svega pH i jonske jačine, prilikom ekstrakcije proteina tako da se obezbedi maksimalna rastvorljivost proteina.

4.3. MOLEKULSKA MASA PROTEINA

Molekulska masa IPST i H1 i H2 je određena pomoću SDS-PAGE elektroforeze. Elektroforetogram molekulskih masa IPST, H1 i H2 prikazan je na slici 14. Elektroforetogram IPST pokazuje tri karakteristične grupe peptida, prvu pri molekularnoj masi od 36 kDa, drugu oko 24 kDa i treću između 14 kDa i 20 kDa. Prve dve grupe peptida, od 36 i 24 kDa potiču od dva polipeptidna lanca iz glavne proteinske frakcije proteina semena tikve, 12S globulina – kukurbitina. Zajedno ova dva polipeptidna lanca čine jednu podjedinicu, a šest takvih podjedinica čine heksamer, kukurbitin, ukupne molekulske mase od oko 352 kDa (Blagrove i Lilley, 1980; Colman i sar., 1980; Marcone, 1999; Rezig i sar., 2013). Treća grupa peptida sa IPST elektroforetograma, molekulske mase 14–20 kDa, pripada 2S albuminskoj frakciji (Rezig i sar., 2013).

Enzimskom hidrolizom IPST dobijeni su hidrolizati H1 i H2, oba sa istim stepenom hidrolize $SH=19\%$, ali sa izrazito različitim profilom molekularnih masa (slika 14)

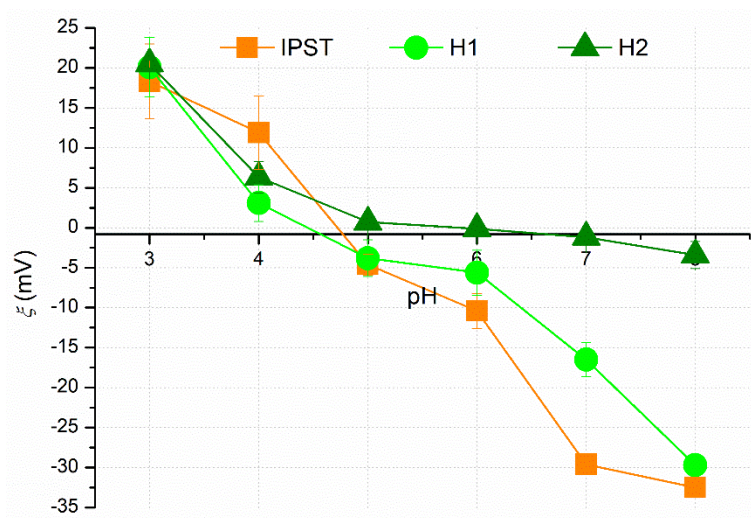


Slika 14. Elektroforetski profili IPST, H1 i H2.

Enzimaska hidroliza alkalazom, gde se kao proizvod dobija hidrolizat H1, je samo blago izmenila elektroforetski profil IPST: sve tri grupe peptida iz IPST su i dalje prisutne ali je intenzitet peptidne grupe oko molekulske mase od 24 kDa pojačan, kao i intenzitet peptidne grupe sa niskim molekulskim masama (14-20 kDa). Sa druge strane, u toku hidrolize IPST pepsinom (H2) svi polipeptidni lanci molekulske mase veće od 20 kDa su hidrolizovani, pa se kao rezultat toga na elektroforetogramu H2 izdvaja samo jedna grupa peptida, sa molekulskom masom manjom od 20 kDa. Razlika u profilima molekulskih masa peptida dobijenih nakon hidrolize istog proteina različitim enzimima se pripisuje specifičnosti mesta katalitičke reakcije za svaki enzim, kao i različitosti uslova pri kojima enzimi deluju (Adjonu i sar., 2014a; Lacou i sar., 2016; Nnanna i Xia, 2001). Naime, alkalaza pripada grupi serinskih endoproteaza, odnosno enzima koji najefikasnije deluju u alkalnoj sredini, a koji imaju široku specifičnost delovanja, sa naglaskom na velike nenaelektrisane aminokiselinske rezidue. Suprotno tome, pepsin, koji spada u kisele endoproteaze, katalizuje raskidanje peptidnih veza kod hidrofobnih, naročito aromatičnih rezidua kao što su fenil-alanin ili leucin (Chatterjee i sar., 2015).

4.4. ZETA POTENCIJAL PROTEINA

Proteini su polimeri dobijeni povezivanjem aminokiselina peptidnom vezom. Peptidna veza, kao i različiti aminokiselinski ostaci, omogućavaju proteinima da nose pozitivno ili negativno naelektrisanje u zavisnosti od pH vrednosti sredine u kojoj se nalaze. Pri pH vrednosti koja je jednaka izoelektričnoj tački proteina, njihovo ukupno naelektrisanje je jednako nuli (Đaković, 2006; Hoffmann i Reger, 2014; Lam i Nickerson, 2013). Pomeranjem pH vrednosti iznad ili ispod izoelektrične tačke dolazi do preovladavanja negativnog, odnosno pozitivnog naelektrisanja, respektivno. Uticaj pH vrednosti na zeta potencijal IPST, H1 i H2 je ilustrovan na slici 15.



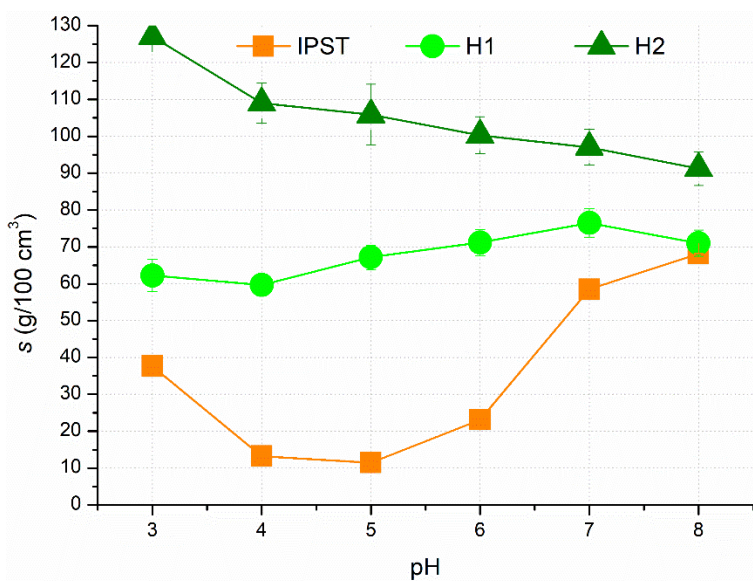
Slika 15. Uticaj pH na zeta potencijal IPST, H1 i H2. $c = 1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$, $I_c = 0 \text{ mol}/\text{dm}^3$.

IPST i H1 imaju sličnu zavisnost zeta potencijala od pH vrednosti sredine: kada je $\text{pH} \leq 4$, IPST i H1 su pozitivno naelektrisani, dok pri $\text{pH} \geq 5$ preovladava negativno naelektrisanje. Dakle, njihova izoelektrična tačka se nalazi između pH 4 i pH 5, gde je zeta potencijal ova dva proteina praktično nula. Uticaj pH na zeta potencijal hidrolizata H2 pokazuje drugačiju zavisnost u poređenju sa zavisnošću koju pokazuju IPST i H1. Zeta potencijal H2 je čak i na $\text{pH} = 5$ pozitivan, dok pri daljem povećavanju pH zeta potencijal H2 postaje blago negativan, a izoelektrična tačka se može zapaziti na $\text{pH} \approx 6,5$. Slične rezultate objavili su (Adjonu i sar., 2014a) za enzimске hidrolizate proteina surutke koji su dobijeni upotrebom različitih enzima i pri različitim uslovima sredine. Uticaj pH vrednosti na zeta potencijal pepsinskih hidrolizata (H2) je posledica kiselosti sredine u kojoj se enzimska hidroliza odigrava ($\text{pH} = 3$), a koja je bliska izoelektričnoj tački nativnog proteina ($\text{pH} \approx 5$), pri čemu su prisutni rastvoreni molekuli slabo naelektrisani. Suprotno tome, kod enzimске hidrolize koja se odvija na $\text{pH} = 8$, odnosno, dalje od izoelektrične tačke IPST, rastvoreni proteini su više naelektrisani (Adjonu i sar., 2014a).

4.5. RASTVORLJIVOST PROTEINA

Funkcionalne osobine proteina su usko povezane sa njihovom rastvorljivošću, pri čemu uslovi sredine, prvenstveno pH i jonska jačina, mogu imati značajan uticaj kako na rastvorljivost proteina, tako i na njegove funkcionalne osobine. Uticaj pH na rastvorljivost IPST, H1 i H2 ilustrovan je na slici 16.

Može se primetiti da je IPST pokazao najnižu rastvorljivost od oko 12 g/100 cm³ u izoelektričnoj tački, pI=5. Rastvorljivost IPST raste kako se pH snižava ispod ili kako se povećava iznad pI, dostižući svoju maksimalnu vrednosti od 68 g/100 cm³ na pH=8, što predstavlja tipičan profil rastvorljivosti za većinu biljnih proteina kod kojih se beleži minimum rastvorljivosti pri pH 4–5 i maksimum rastvorljivosti u alkalnoj sredini (Yuliana i sar., 2014; Yust i sar., 2010). Rastvorljivost proteina je, pre svega, određena njihovim naelektrisanjem na različitim pH vrednostima. Rastvorljivost je minimalna na pH = pI, kada se proteini nalaze u obliku cviter jona, pri čemu balans između pozitivnog i negativnog naelektrisanja čini molekule proteina efektivno nenaelektrisanim što značajno otežava njihovu solvataciju, i time smanjuje rastvorljivost.



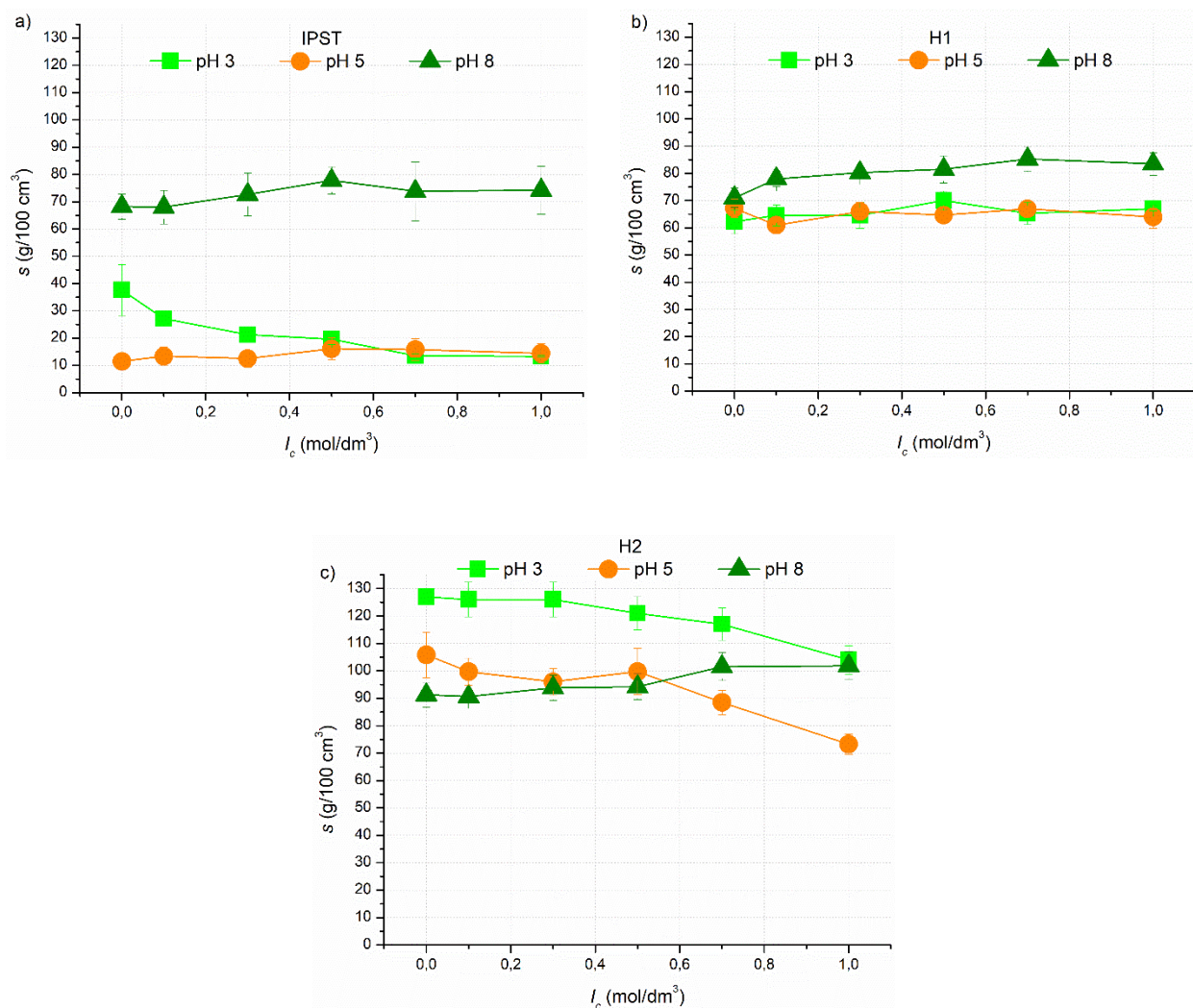
Slika 16. Uticaj pH na rastvorljivost IPST, H1 i H2. $c_{susp} = 1 \text{ g/100 cm}^3$, $I_c = 0 \text{ mol/dm}^3$.

Nasurot tome, udaljavanjem pH od pI, solvatacija proteina se pospešuje povećavanjem naelektrisanja proteina, dovodeći do povećanja rastvorljivosti (Amine i sar., 2014; Bessada i sar., 2019; Chatterjee i sar., 2015; Deng i sar., 2011; Hoffmann i Reger, 2014; Wang i sar., 2019; Yuliana i sar., 2014).

Ispitivanja su pokazala da je rastvorljivost H1 i H2, veća od rastvorljivosti IPST, u celom opsegu ispitivanih pH, a posebno u opsegu pH bliskim pI IPST, slika 16. Rastvorljivost oba hidrolizata, H1 i H2, u manjoj meri zavisi od pH vrednosti u poređenju sa IPST. Naime, rastvorljivost H1 se kreće u opsegu između 60 g/100 cm³ i 76 g/100 cm³, dok je rastvorljivost H2 veća od 90 g/100 cm³ pri svim ispitanim pH vrednostima (Slika 16). Veća rastvorljivost hidrolizata u odnosu na IPST je posledica redukcije sekundarne strukture nativnog proteina tokom enzimske hidrolize, zatim, manje molekulske mase novonastalih peptida i prisustva jonizovanih amino i karboskilnih grupa koje su prethodno bile sakrivene unutar strukture proteina, što zajedno uzrokuje povećanje hidrofилности hidrolizata (Sinha i sar., 2007; Tavano, 2013; Wu i sar., 2009; Yalçın i Çelik, 2007; Yust i sar., 2010; Zhao i sar., 2011).

Uticao jonske jačine rastvora na rastvorljivost IPST, H1 i H2, pri različitim pH vrednostima, prikazana je na slici 17a, 17b i 17c, respektivno. Mogu se primetiti dva različita efekta u zavisnosti od pH vrednosti sredine i vrste proteina:

- I *salting-out* efekat – smanjenje rastvorljivosti prilikom povećanja jonske jačine;
- II *salting-in* efekat – povećanje rastvorljivosti prilikom povećanja jonske jačine.



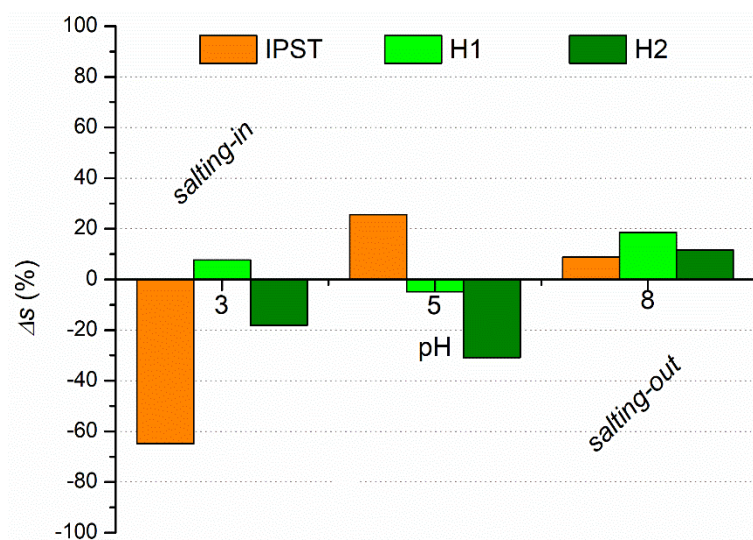
Slika 17. Uticaj jonske jačine rastvora na rastvorljivost a) IPST, b) H1 i c) H2, pri različitoj pH vrednosti (3, 5 i 8). $c_{susp} = 1 \text{ g/100 cm}^3$.

Kao posledica povećanja jonske jačine, rastvorljivost IPST na pH 3 značajno opada sa $37,6 \text{ g/100 cm}^3$ na $13,2 \text{ g/100 cm}^3$, demonstrirajući tipičan *salting-out* efekat, dok se na pH 8 i pH 5 inicijalno ispoljava blagi *salting-in* efekat do jonske jačine od $0,5 \text{ mol/dm}^3$ NaCl, a zatim sledi opadanje rastvorljivosti usled daljeg povećanja jonske jačine (Slika 17a). Dobijeni rezultati su u skladu sa ranije sprovedenim istraživanjima, gde je ustanovljeno da povećanje jonske jačine rastvora izolata proteina suncokreta dovodi do

salting-out efekta, kada je $\text{pH} < \text{pI}$, odnosno do *salting-in* efekta, kada je $\text{pH} \geq \text{pI}$ (Pérez i sar., 2005). Pored toga, povećanje rastvorljivosti do određene jonske jačine ($I_c = 0,5 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$), nakon čega sledi pad rastvorljivosti daljim povećanjem jonske jačine, zabeleženo je i kod drugih izolata biljnih proteina, npr. indijskog oraha (Yuliana i sar., 2014), semena ginko bilobe (Deng i sar., 2011) i susama (Achouri i sar., 2012).

Enzimskom hidrolizom IPST alkalazom dobijen je hidrolizat H1 kod kog je ustanovljeno da povećanje jonske jačine praktično ne utiče na rastvorljivost na pH 3 i pH 5, dok pri pH 8 rastvorljivost H1 se povećava za 14 g/100 cm^3 prilikom povećanja I_c sa 0 mol/dm^3 na $0,7 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$ (Slika 17b). Sa druge strane, povećanje jonske jačine rastvora hidrolizata dobijenog upotrebom pepsina, H2, dovodi do opadanja rastvorljivosti na pH 3 i pH 5. Rastvorljivost H2 na pH=8 se povećava za 10 g/100 cm^3 , kao posledica povećanja I_c sa 0 mol/100 cm^3 na $1 \text{ mol/100 cm}^3 \text{ NaCl}$, ispoljavajući blagi *salting-in* efekat (Slika 17c).

Ukupna promena rastvorljivosti IPST, H1 i H2, Δs (g/100 cm^3), prilikom povećanja jonske jačine od 0 mol/dm^3 do $1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$ pri pH 3, 5 i 8 prikazana je na Slici 18.



Slika 18. Ukupna promena rastvorljivosti IPST, H1 i H2, Δs (g/100 cm^3), prilikom povećanja jonske jačine od 0 mol/dm^3 do $1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$ pri pH 3, 5 i 8.

Oba efekta, *salting-out* i *salting-in*, su zabeležena kod sva tri ispitana uzorka, IPST, H1 i H2. Najizraženiji *salting-out* efekat se javlja kod IPST na pH 3, gde je $\Delta s = 64,8 \%$, a najizraženiji *salting-in* se javlja kod IPST na pH 5, pri čemu se rastvorljivost povećava za 25,6 %. Jedino u alkalnoj sredini, na pH = 8, kod sva tri uzorka, IPST, H1 i H2, se javlja samo *salting-in* efekat, $\Delta s > 0 \%$.

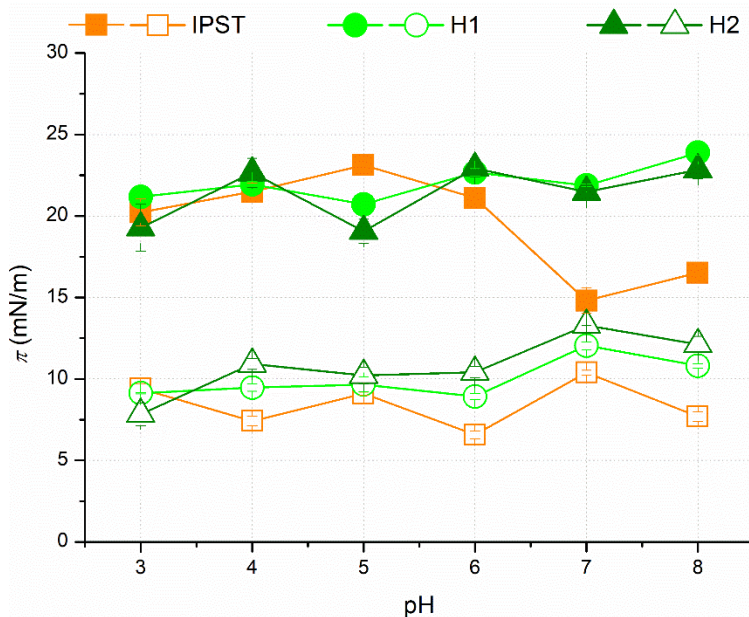
Uticao jonske jačine na rastvorljivost proteina je rezultat kompleksnog uzajamnog dejstva različitih efekata poput elektrostatičkih interakcija, jon specifičnih interakcija, hidrofobnih efekata, itd. (Marcone, 1999; Yalçın i Çelik, 2007).

4.6. ADSORPCIONA SVOJSTVA

Ispitana je adsorpcija IPST, H1 i H2 na granicu faza tečno/gas i tečno/tečno, kao i osobine dobijenih proteinskih adsorpcionih filmova. Adsorpciona svojstva su ispitivana određivanjem površinskog i međupovršinskog pritiska, dinamičkog međupovršinskog pritiska i kinetike adsorpcije pri različitim uslovima sredine, pH (3–8) i jonske jačine (0–1 mol/dm³ NaCl), i koncentracije uzorka (0,0001–1 g/100 cm³).

4.6.1. POVRŠINSKI I MEĐUPOVRŠINSKI PRITISAK

Proteini su amfifilni molekuli koji se adsorbuju na granicu faza tečnost/gas i tečnost/tečnost. Tom prilikom dolazi do smanjenja površinskog/međupovršinskog napona, odnosno do povećanja površinskog/međupovršinskog pritiska. Uticaj pH vrednosti na površinski i međupovršinski pritisak rastvora IPST, H1 i H2 prikazan je na slici 19. Može se primetiti da je površinski i međupovršinski pritisak veći od 0 mN/m što ukazuje na to da se IPST, H1 i H2 adsorbuju na granicu faza pri svim ispitivanim pH vrednostima. Utvrđeno je da rastvor IPST pokazuje najveći površinski pritisak, 23 mN/m,



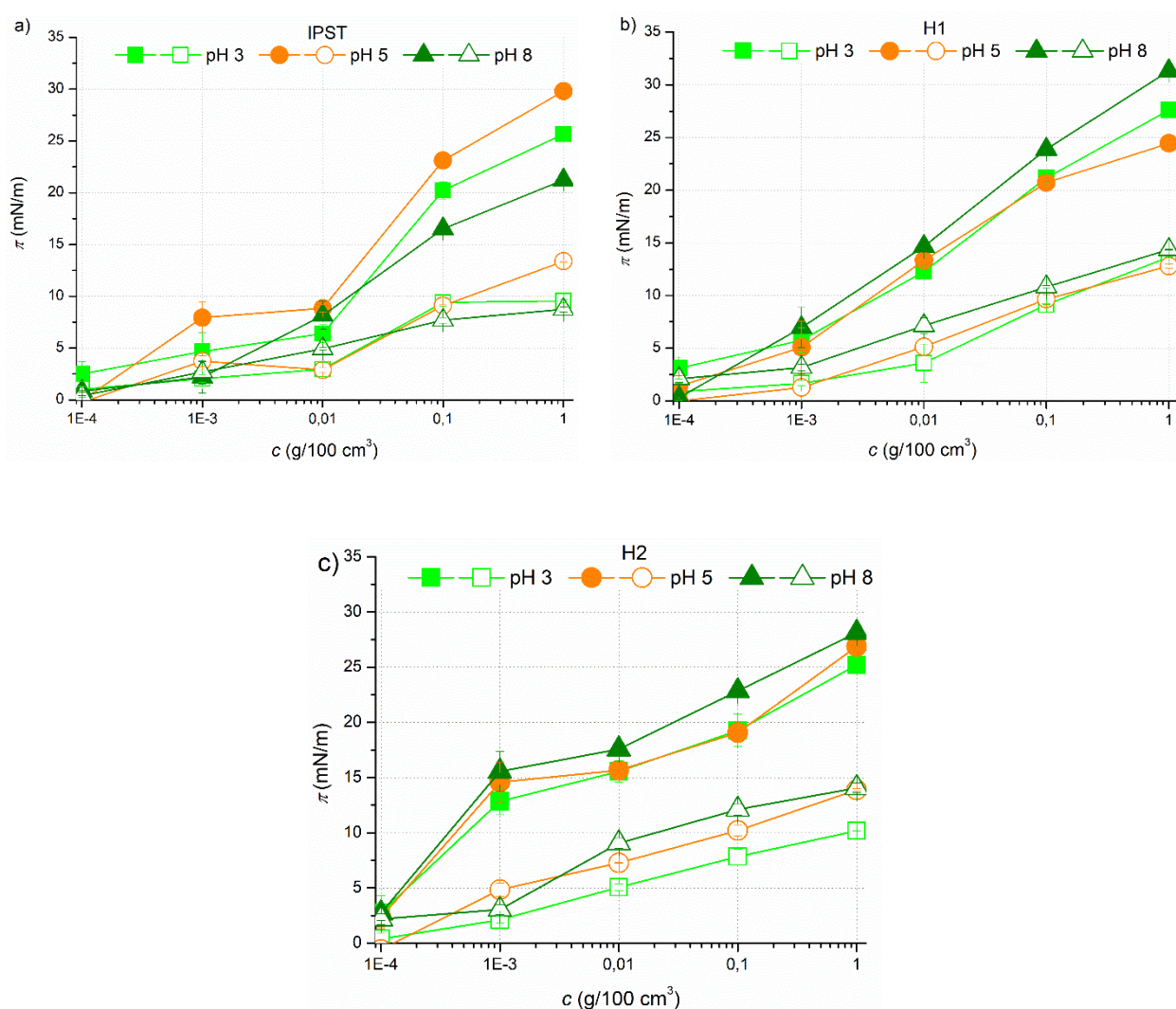
Slika 19. Uticaj pH vrednosti na površinski (ispunjeni simboli) i međupovršinski pritisak (prazni simboli) rastvora IPST, H1 i H2. $c=0,1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$; $I_c=0 \text{ mol}/\text{dm}^3$.

na $pI=5$, dok se sa snižavanjem pH ispod ili povećavanjem iznad pI , površinski pritisak rastvora IPST snižava. Najviši površinski pritisak ($22,6 \text{ mN}/\text{m}$) upravo u izoelektričnoj tački je posledica smanjene rastvorljivosti i intenziviranih hidrofobnih interakcija koje su pospešile adsorpciju IPST molekula na granicu faza da bi se minimizovale termodinamički nepovoljne hidrofobne interakcije (Papalamprou i sar., 2010). Suprotno tome, na $pH \neq pI$ proteinski molekuli su postali hidratisaniji, njihova rastvorljivost je povećana (Slika 16), a hidrofobne interakcije koje pospešuju adsorpciju IPST na granicu faza su smanjene, što se ogleda u smanjenju površinskog pritiska rastvora IPST, u odnosu na pI , na $16,5 \text{ mN}/\text{m}$ na $pH 8$ i na $20 \text{ mN}/\text{m}$ na $pH 3$. Uticaj pH na površinski pritisak rastvora H1 i H2 je manje izražen u poređenju sa uticajem pH na površinski pritisak IPST, tako da površinski pritisak H1 iznosi između $21 \text{ mN}/\text{m}$ i $24 \text{ mN}/\text{m}$, a površinski pritisak H2 između $19 \text{ mN}/\text{m}$ i $23 \text{ mN}/\text{m}$, bez obzira na pH (Slika 19).

Sa slike 19. se uočava da su međupovršinski pritisci rastvora IPST, H1 i H2 u odnosu: $\pi_{IPST} < \pi_{H1} < \pi_{H2}$ na svim ispitanim pH vrednostima osim na $pH 3$. Manja molekulska masa H1 i H2 u odnosu na IPST uslovljava viši međupovršinski pritisak

rastvora H1 i H2 u odnosu na međupovršinski pritisak rastvora IPST usled veće fleksibilnosti redukovanih peptida i dostupnosti hidrofobnih grupa koje su prethodno bile sakrivene unutar strukture nativnog proteina što pospešuje adsorpciju H1 i H2 na granicu faza (Adjonu i sar., 2014b; Avramenko i sar., 2013; Luo i sar., 2014; Martínez i sar., 2009; Miñones Conde i Rodríguez Patino, 2007).

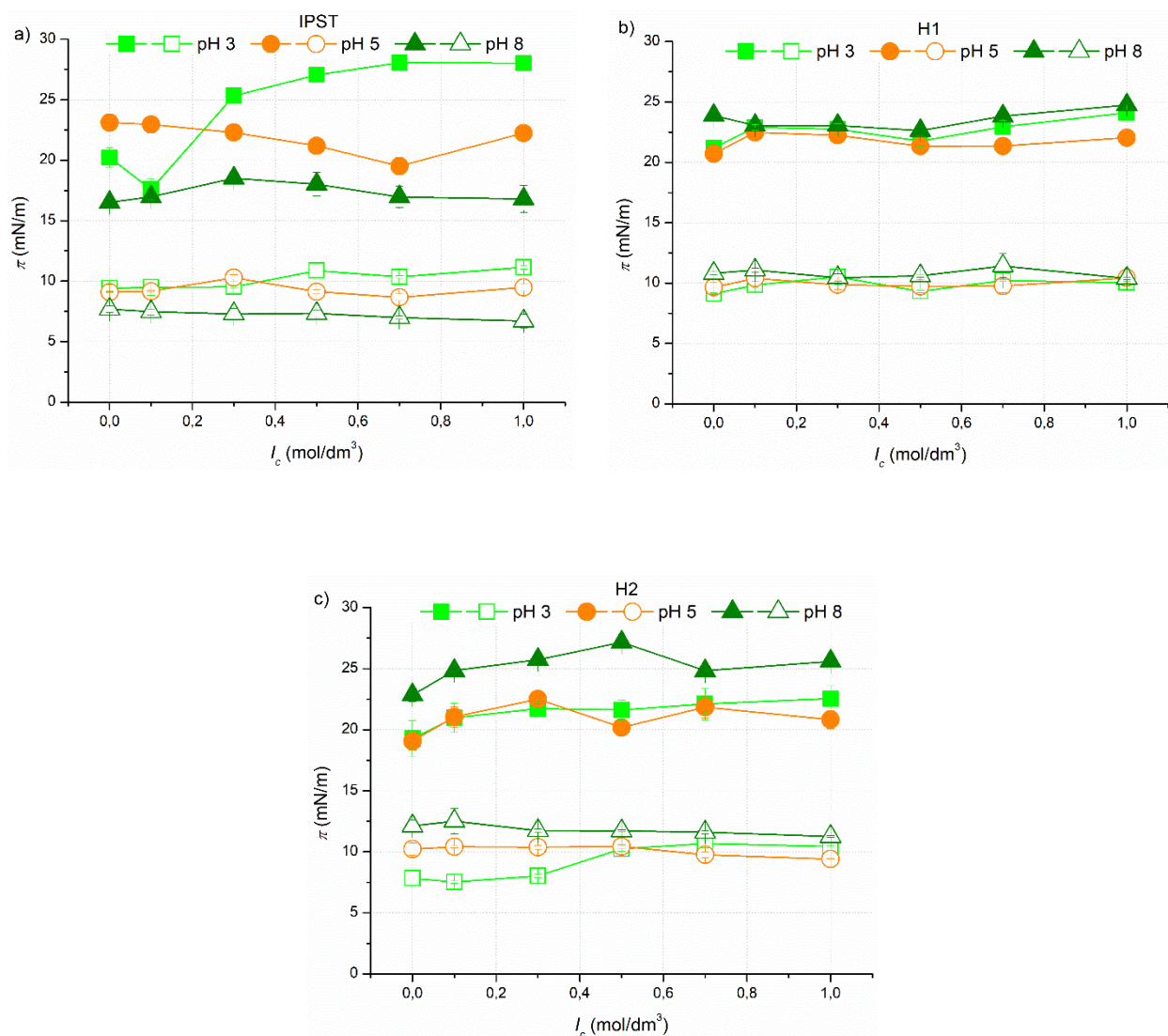
Uticaj koncentracije rastvora IPST, H1 i H2 na površinski i međupovršinski pritisak prikazan je na slici 20a, 20b i 20c, respektivno, na pH 3, 5 i 8.



Slika 20. Uticaj koncentracije rastvora a) IPST, b) H1 i c) H2 na površinski (ispunjeni simboli) i međupovršinski (prazni simboli) pritisak rastvora na pH 3, 5 i 8. $I_c=0 \text{ mol/dm}^3$.

Kao što je i očekivano, koncentracija proteinskog rastvora ima značajan uticaj na površinski i međupovršinski pritisak rastvora. Što je veća koncentracija rastvora IPST, H1 i H2 – to je veći i površinski/međupovršinski pritisak, bez obzira na pH vrednost rastvora. Naime, povećanjem koncentracije proteina u rastvoru povećan je broj adsorbovanih peptida na granci faza što za rezultat ima povećanje površinskog/međupovršinskog pritiska (Bos i Van Vliet, 2001). Najveći površinski/međupovršinski pritisak je izmeren pri najvišoj koncentraciji rastvora proteina, $c=1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$, za sva tri uzorka i na sve tri ispitivane pH vrednosti rastvora. Maksimalan površinski pritisak rastvora IPST iznosio je od 20 mN/m do 30 mN/m, u zavisnosti od pH vrednosti, što predstavlja maksimalan površinski pritisak koji se može postići upotrebom proteina (Bos i Van Vliet, 2001; Damodaran, 2005; Dickinson, 2011). Približne vrednosti površinskog pritiska zabeležene su upotrebom proteinskih izolata biljnog porekla: sočiva (Joshi i sar., 2012), ovsa (Ercili-Cura i sar., 2015), soje (Ruíz-Henestrosa i sar., 2007b), i proteinskih izolata animalnog porekla: surutke (Joshi i sar., 2012; van Kempen i sar., 2013), β -laktoglobulina i β -kazeina (Seta i sar., 2014).

Uticaj povećanja jonske jačine na površinski/međupovršinski pritisak rastvora IPST, H1 i H2 je prikazan na slici 21a, 21b i 21c, respektivno, na tri različite pH 3, 5 i 8. Povećanje jonske jačine rastvora veoma malo utiče na površinski i međupovršinski pritisak ispitivanih rastvora, osim u slučaju rastvora IPST na pH 3, gde je zabeleženo značajnije povećanje površinskog pritiska za 10,5 mN/m usled povećanja koncentracije NaCl sa $0 \text{ mol}/\text{dm}^3$ na $1 \text{ mol}/\text{dm}^3$. Takvo ponašanje je posledica smanjene rastvorljivosti IPST na pH 3 (Slika 17) odnosno, povećanja hidrofobnih interakcija i smanjene hidratacije proteina. Izuzev toga, povećanje jonske jačine se minimalno odrazilo na površinski i međupovršinski pritisak svih ostalih rastvora, što je potkrepljeno činjenicom da je prosečna varijacija u okviru jedne pH vrednosti 3 mN/m za površinski pritisak i 1,4 mN/m za međupovršinski pritisak.

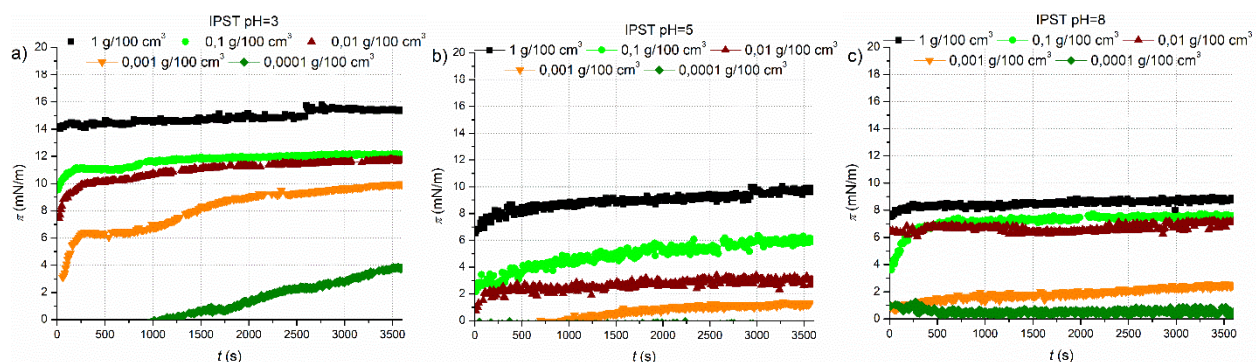


Slika 21. Uticaj jonske jačine na površinski (ispunjeni simboli) i međupovršinski (prazni simboli) pritisak a) IPST, b) H1 i c) H2, na pH 3, 5 i 8. $c=0,1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$.

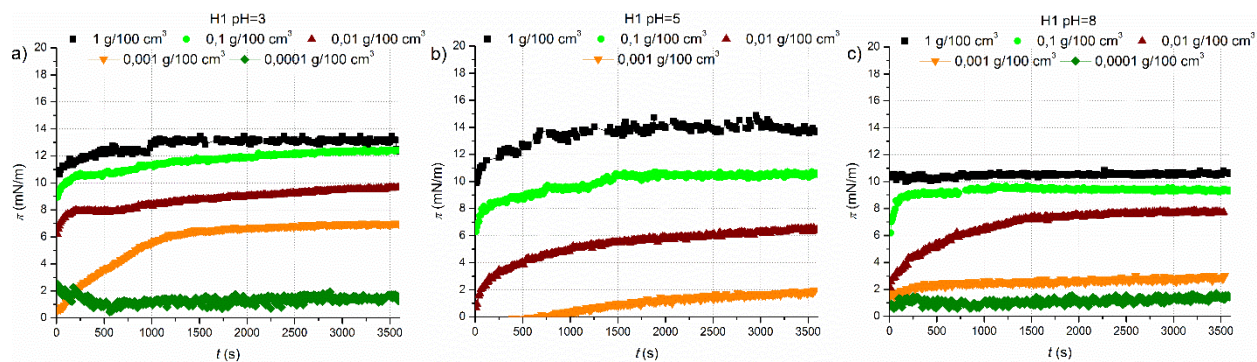
4.6.2. DINAMIČKI MEĐUPOVRŠINSKI PRITISAK

Ispitan je uticaj vremena na međupovršinski pritisak granice faza između rastvora proteina i ulja triglicerida srednje dužine lanca. Dinamički međupovršinski pritisak

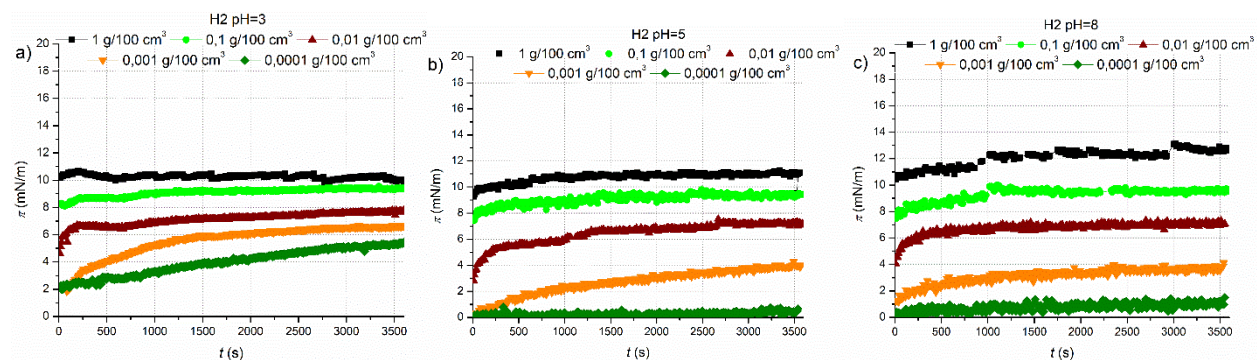
rastvora IPST, H1 i H2 je prikazan na slici 22, slici 23 i slici 24, respektivno, na pH 3, 5 i 8. Primećuje se da tokom vremena dolazi do povećanja međupovršinskog pritiska, π , na granici faza ulje/rastvor proteina, za sva tri ispitivana proteina bez obzira na pH vrednost rastvora. Takvo ponašanje ukazuje na to da se IPST, H1 i H2 adsorbuju na granicu faza ulje–rastvor proteina, bez obzira na pH rastvora. Povećanje π tokom vremena pri koncentraciji $c > 0,0001 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$, najizraženije je na početku merenja, bez obzira na pH vrednost rastvora. Takav trend se objašnjava činjenicom da je na početku adsorpcije granica faza ulje–rastvor proteina prazna, te je adsorpcija molekula IPST, H1 ili H2 olakšana. Tokom vremena, koncentracija IPST, H1 i H2 na granici faza se povećava, pri čemu dolazi do povećanja energetskih barijera (elektrostatičke barijere i barijere međupovršinskog pritiska) koje otežavaju dalju adsorpciju novih molekula proteina, što na kraju dovodi do smanjenja brzine adsorpcije i konačno, do toga da povećanje π tokom vremena postane sve umerenije (Maldonado-Valderrama i sar., 2005; Rodríguez Patino i sar., 2007; Romero i sar., 2012; Ruíz-Henestrosa i sar., 2007a; Tang i Shen, 2015; Yuan i sar., 2012).



Slika 22. Dinamički međupovršinski pritisak rastvora IPST pri različitoj koncentraciji c (1–0,0001 g/100 cm³) na a) pH 3 b) pH 5 i c) pH 8. $I_c=0 \text{ mol}/\text{dm}^3$.



Slika 23. Dinamički međupovršinski pritisak rastvora H1 pri različitoj koncentraciji c (1–0,0001 g/100 cm³) na a) pH 3 b) pH 5 i c) pH 8. $I_c=0$ mol/dm³.

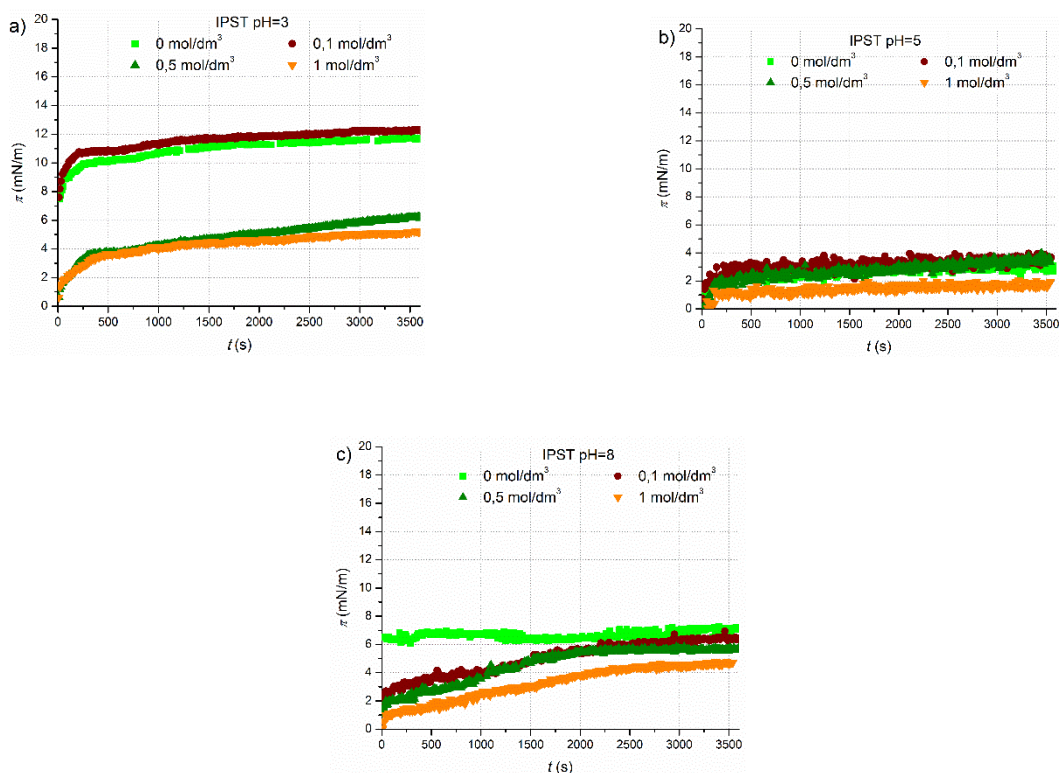


Slika 24. Dinamički međupovršinski pritisak rastvora H2 pri različitoj koncentraciji c (1–0,0001 g/100 cm³) na a) pH 3 b) pH 5 i c) pH 8. $I_c=0$ mol/dm³.

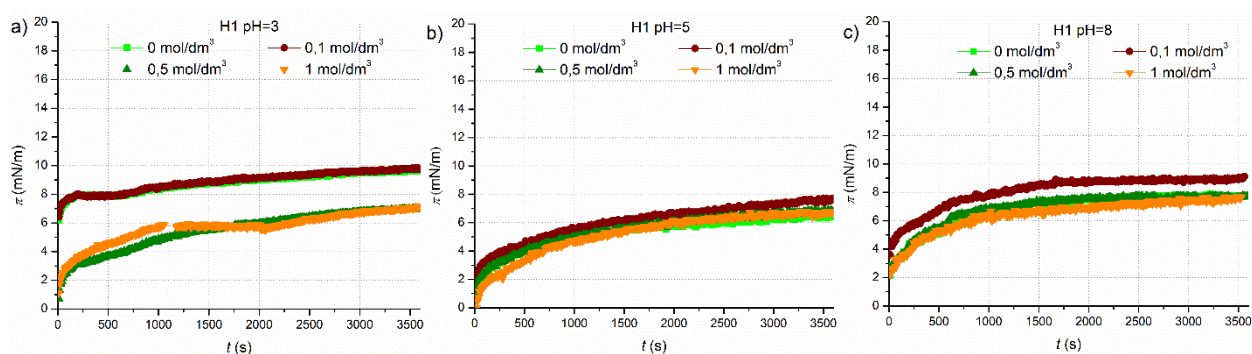
Izuzetak od goreopisanog ponašanja su uzorci IPST na pH 3 i pH 5 i H1 i H2 na pH 5 pri najnižoj koncentraciji, kod kojih izostaje početno naglo povećanje π , a umesto njega se javlja indukcion period u okviru kog ne dolazi do promene π . Povećanje π na pH 3 kod IPST se javlja tek nakon 1000 s. Pojava indukcionog perioda na pH 5 je posledica izražene asocijacije molekula proteina u izoelektričnoj tački koja je rezultat malog naelektrisanja proteina (Damodaran, 2005; Joshi i sar., 2012; McClements, 2004b;

Rodriguez Patino i Pilosof, 2011; Ruíz-Henestrosa i sar., 2009; Yuliana i sar., 2014). Takođe, veoma niska koncentracija rastvora proteina doprinosi ovom efektu.

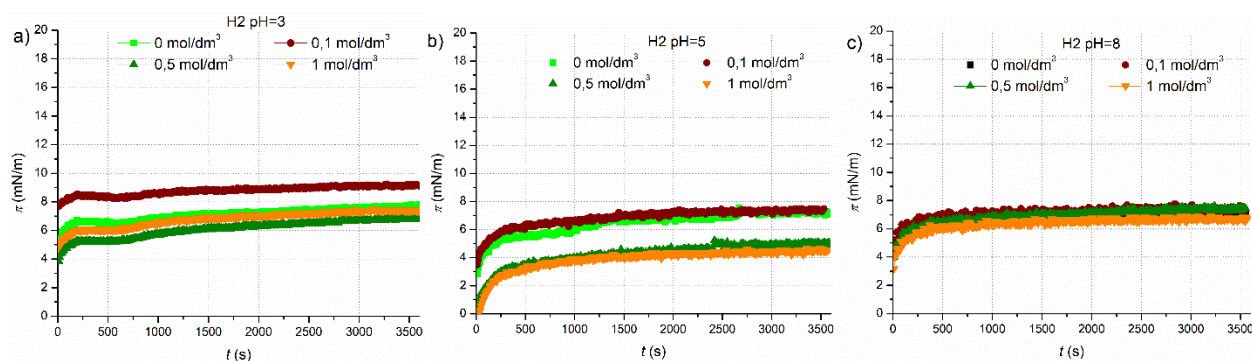
Uticaj povećanja jonske jačine na dinamički površinski pritisak rastvora IPST, H1 i H2 prikazan je na slici 25, slici 26 i slici 27, pri različitim pH vrednostima rastvora, pH 3, pH 5 i pH 8. Međupovršinski pritisak rastvora IPST, H1 i H2 se najviše povećava na početku merenja a zatim se je povećanje sve umerenije, na svim ispitivanim pH vrednostima i jonskim jačinama rastvora, izuzev rastvora IPST na pH 8, gde se promene međupovršinskog pritiska dešavaju tokom dužeg vremenskog perioda (slika 25c).



Slika 25. Dinamički međupovršinski pritisak rastvora IPST pri različitoj jonskoj jačini I_c (0–1 mol/dm³ NaCl) na a) pH 3 b) pH 5 i c) pH 8. $c=0,01$ mol/dm³.



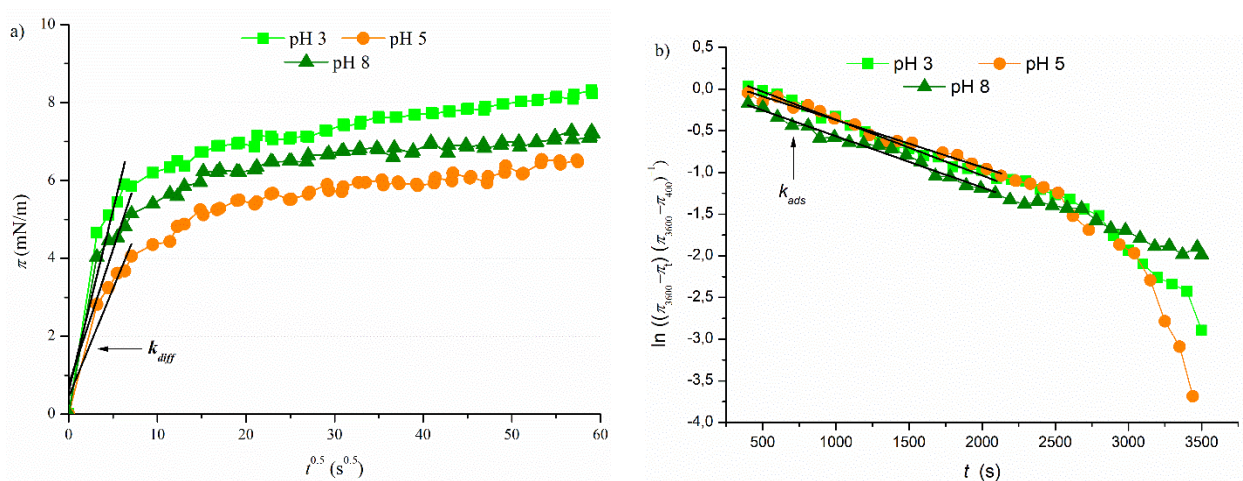
Slika 26. Dinamički međupovršinski pritisak rastvora H1 pri različitoj jonskoj jačini I_c (0–1 mol/dm³ NaCl) na a) pH 3 b) pH 5 i c) pH 8. $c=0,01$ mol/dm³.



Slika 27. Dinamički međupovršinski pritisak rastvora H2 pri različitoj jonskoj jačini I_c (0–1 mol/dm³ NaCl) na a) pH 3 b) pH 5 i c) pH 8. $c=0,01$ mol/dm³.

4.6.3. KINETIKA ADSORPCIJE

Difuzija IPST, H1 i H2 iz rastvora do granice faza, a zatim i adsorpcija na granicu faza može biti okarakterisana konstantom brzine difuzije, k_{diff} , i konstantom brzine adsorpcije, k_{ads} , respektivno. Primer određivanja k_{diff} i k_{ads} reprezentativnih H2 rastvora na različitim pH vrednostima prikazan je na slici 28a i 28b, respektivno.



Slika 28. Primer grafičkog određivanja a) k_{diff} i b) k_{ads} . Rastvori H2, $c=0,01 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$, $I_c=0 \text{ mol}/\text{dm}^3$.

k_{diff} se određuje kao linearni nagib na grafiku zavisnosti π od kvadratnog korena vremena adsorpcije, $t^{1/2}$ (Slika 28a), a k_{ads} kao prvi linearni region na grafiku zavisnosti $\ln((\pi_{3600}-\pi_t)/(\pi_{3600}-\pi_{400}))$ od vremena (Slika 28b) (Jarpa-Parra i sar., 2015; Patino i sar., 2005; Ruíz-Henestrosa i sar., 2009; Tang i Shen, 2015).

Uticaj pH vrednosti i koncentracije rastvora IPST, H1 i H2 na k_{diff} i k_{ads} prikazan je u Tabeli 3. k_{diff} rastvora IPST raste sa povećanjem koncentracije rastvora proteina, bez obzira na pH vrednost, sa izuzetkom rastvora koncentracije $0,1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ na pH 8. Pri najvišoj koncentraciji rastvora IPST, $c=1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$, nije bilo moguće odrediti k_{diff} i k_{ads} usled činjenica da se inicijalna promena međupovršinskog napona odigrala u isuviše kratkom vremenskom periodu, koji prevazilazi mogućnosti merenja korišćene metode. k_{diff} oba hidrolizata, H1 i H2, se takođe povećavaju sa povećanjem koncentracije rastvora na svim ispitanim pH vrednostima. Najniže vrednosti k_{diff} , za sve ispitivane koncentracije rastvora, određene su na pH 5, što je posledica asocijacije molekula na $\text{pH}=\text{pI}$ zbog slabog naelektrisanja peptida. Povećanje dimenzija entiteta koji difunduju usporava njihovu difuziju ka granici faza. Slično ponašanje je zabeleženo i kod drugih nativnih i modifikovanih globularnih proteina (Jarpa-Parra i sar., 2015; Patino i sar., 2005; Rodríguez Niño i sar., 2005; Ruíz-Henestrosa i sar., 2009, 2007b; Yuliana i sar., 2014). Iz

Tabele 3. može se primetiti da su k_{diff} H1 i H2 veće u odnosu na k_{diff} IPST, bez obzira na koncentraciju i pH vrednost rastvora, što je posledica smanjene molekulske mase hidrolizata usled enzimske hidrolize (Rodríguez Niño i sar., 2005; Ruíz-Henestrosa i sar., 2009).

Tabela 3. Uticaj pH vrednosti i koncentracije rastvora IPST, H1 i H2 na k_{diff} i k_{ads} . $I_c=0$ mol/dm³.

pH	c (g/100 cm ³)	k_{diff} (mN/m*s ^{0.5})			k_{ads} *10 ⁻⁴ (1/s)		
		IPST	H1	H2	IPST	H1	H2
3	0,0001	x	0,02 ± 0,00	0,26 ± 0,01	x	2,5 ± 0,3	6,0 ± 0,1
	0,001	0,15 ± 0,00	0,21 ± 0,01	0,22 ± 0,01	6,8 ± 0,1	7,2 ± 0,2	9,7 ± 0,1
	0,01	0,42 ± 0,02	0,86 ± 0,04	0,82 ± 0,22	9,5 ± 0,2	8,4 ± 0,1	7,5 ± 1,3
	0,1	0,61 ± 0,03	2,05 ± 0,10	x	9,5 ± 0,2	8,9 ± 0,2	5,9 ± 0,4
	1	x	x	x	9,4 ± 1,0	7,8 ± 1,5	x
5	0,0001	x	x	0,01 ± 0,01	x	x	1,5 ± 0,3
	0,001	0,03 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,00	8,2 ± 0,5	8,4 ± 0,2	5,4 ± 0,3
	0,01	0,16 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,55 ± 0,13	4,9 ± 0,0	8,7 ± 0,1	4,2 ± 0,3
	0,1	0,21 ± 0,03	0,35 ± 0,03	x	7,0 ± 0,2	8,6 ± 0,2	3,8 ± 0,4
	1	x	x	x	6,6 ± 0,5	9,1 ± 0,5	x
8	0,0001	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,7 ± 0,5	3,5 ± 0,4	4,2 ± 0,4
	0,001	0,04 ± 0,00	0,14 ± 0,02	0,08 ± 0,01	3,5 ± 0,2	3,61 ± 0,3	6,5 ± 0,3
	0,01	0,61 ± 0,08	0,53 ± 0,06	0,69 ± 0,14	3,5 ± 0,7	13,9 ± 0,2	5,5 ± 0,5
	0,1	0,39 ± 0,06	0,96 ± 0,19	x	5,8 ± 0,4	2,0 ± 0,2	5,3 ± 0,3
	1	x	x	x	3,0 ± 0,4	4,1 ± 0,0	x

Tokom vremena sve više molekula proteina se adsorbuje na granicu faza što dovodi do postepenog povećavanja energetske barijere za adsorpciju novih molekula proteina. Proces adsorpcije molekula iz graničnog sloja na granicu faza stoga postaje sve sporiji i difuziona adsorpcija prelazi u difuziono–kinetičku adsorpciju gde brzina adsorpcije proteina iz graničnog sloja na granicu faza određuje brzinu ukupnog procesa oadsorpcije (Maldonado-Valderrama i sar., 2005; Rodríguez Niño i sar., 2005; Ruíz-Henestrosa i sar., 2007a). Brzina adsorpcije iz graničnog sloja na granicu faza može se kvantifikovati pomoću k_{ads} (tabela 3), gde veće vrednosti k_{ads} odgovaraju bržoj adsorpciji iz graničnog sloja na granicu faza. Primećuje se da uticaj pH vrednosti i koncentracije rastvora IPST, H1 i H2 na k_{ads} zavisi od vrste isptivanog proteina. Najveće vrednosti k_{ads} IPST određene su na pH 3 bez obzira na koncentraciju rastvora, pri čemu k_{ads} opada sa povećanjem pH. k_{ads} hidrolizata H1, za datu koncentraciju na pH 5 su blago povećane u odnosu na k_{ads} na pH 3, dok su najniže vrednosti k_{ads} H1 na pH 8. U slučaju k_{ads} H2, najviše vrednosti se dobijaju na pH 3, slično kao kod IPST, a najniže na pH 5.

Uticaj jonske jačine na k_{diff} i k_{ads} pri različitim pH vrednostima, prikazana je u Tabeli 4. Kod svih uzoraka, IPST, H1 i H2, k_{diff} opada sa povećanjem jonske jačine bez obzira na pH, sa izuzetkom IPST i H1 na pH 5 gde je uticaj dodatka NaCl na k_{diff} mali. Struktura proteinskih molekula na pH 5 je zbijena i bez prisustva NaCl ($I_c=0$ mol/dm³) usled slabog naelektrisanja, odnosno malog zeta potencijala (Slika 15). Prema tome, dodatak NaCl ne dolazi do značajnijih promena u strukturi proteina, dok pri pH≠pI povećanje jonske jačine ima kompleksan uticaj na strukturu proteina i njihovu asocijaciju (Bolontrade i sar., 2016; Joshi i sar., 2012).

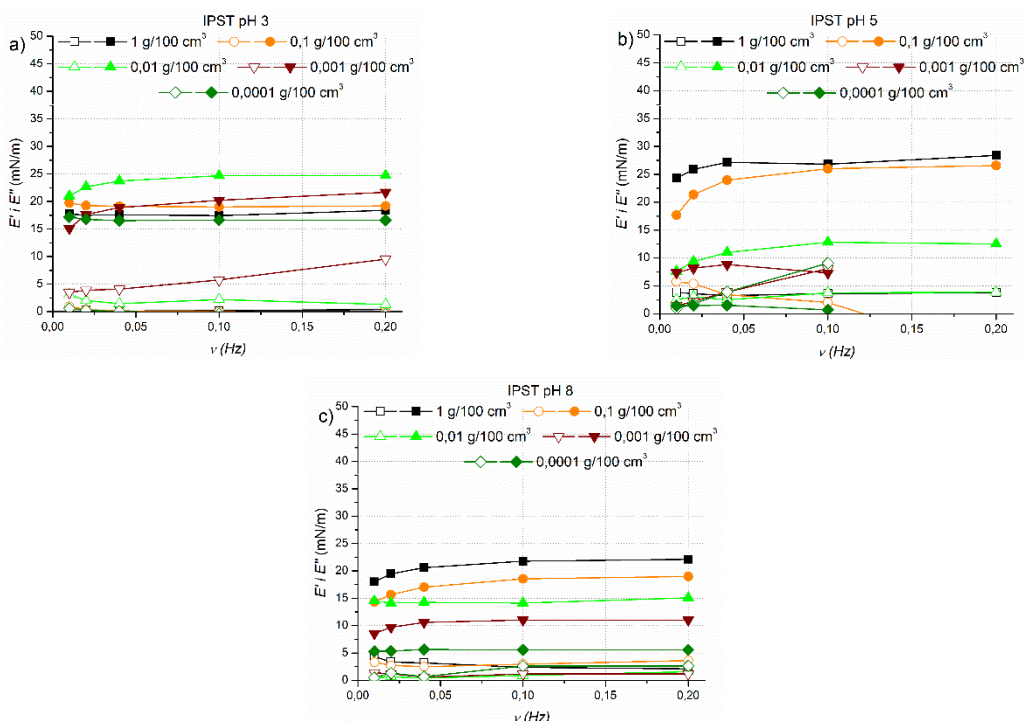
Tabela 4. Uticaj jonske jačine rastvora IPST, H1 i H2 na k_{diff} i k_{ads} pri različitoj pH vrednosti (3, 5 i 8). $c=0,01$ g/100 cm³.

pH	I_c (mol/dm ³)	k_{diff} (mN/m*s ^{0.5})			k_{ads} *10 ⁻⁴ (1/s)		
		IPST	H1	H2	IPST	H1	H2
3	0	0,42 ± 0,02	0,66 ± 0,04	0,82 ± 0,23	9,5 ± 0,2	8,4 ± 0,1	8,2 ± 0,9
	0,1	0,28 ± 0,01	0,60 ± 0,07	0,76 ± 0,12	7,6 ± 0,1	7,5 ± 0,1	8,9 ± 0,2
	0,5	0,20 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,34 ± 0,01	5,4 ± 0,1	7,3 ± 0,3	8,7 ± 0,2
	1	0,16 ± 0,01	0,19 ± 0,00	0,11 ± 0,00	6,5 ± 0,2	4,5 ± 0,3	6,5 ± 0,2
5	0	0,16 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,55 ± 0,12	4,9 ± 0,0	8,7 ± 0,1	4,2 ± 0,3
	0,1	0,15 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,48 ± 0,11	2,6 ± 0,3	8,3 ± 0,1	7,0 ± 0,3
	0,5	0,23 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,23 ± 0,00	3,8 ± 0,2	7,8 ± 0,1	6,6 ± 0,1
	1	0,12 ± 0,03	0,16 ± 0,01	0,26 ± 0,00	3,3 ± 0,2	9,3 ± 0,1	6,5 ± 0,1
8	0	0,61 ± 0,08	0,35 ± 0,01	0,69 ± 0,11	3,5 ± 0,7	13,9 ± 0,2	5,5 ± 0,5
	0,1	0,41 ± 0,08	0,81 ± 0,17	0,64 ± 0,23	7,8 ± 0,2	14,0 ± 0,2	5,2 ± 0,5
	0,5	0,31 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,53 ± 0,12	13,0 ± 0,3	5,8 ± 0,1	6,1 ± 0,3
	1	0,08 ± 0,00	0,19 ± 0,02	0,26 ± 0,10	8,7 ± 0,2	7,6 ± 0,1	6,4 ± 0,3

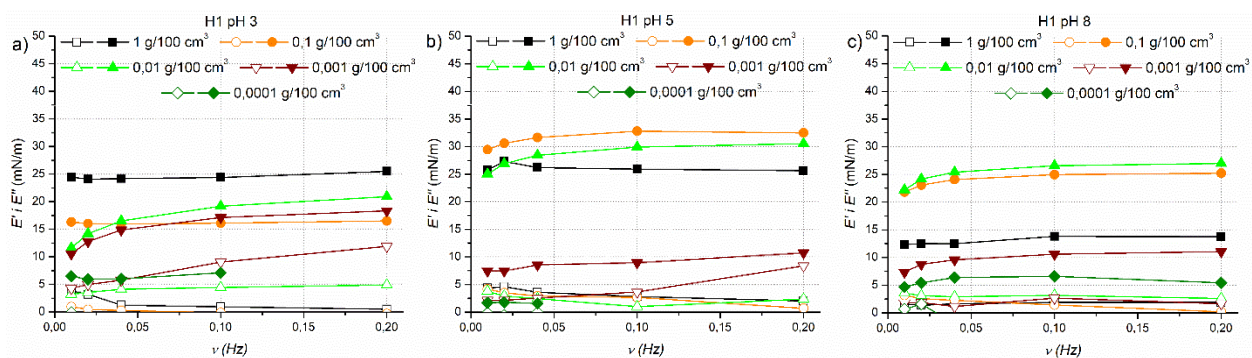
Uticaj povećanja jonske jačine na k_{ads} ne pokazuje jednoznačne trendove opadanja ili povećanja k_{ads} , usled povećanja jonske jačine, bez obzira na vrstu ispitivanog uzorka ili pH vrednost rastvora.

4.6.4. DILATACIONA REOLOGIJA PROTEINSKIH ADSORPCIONIH FILMOVA

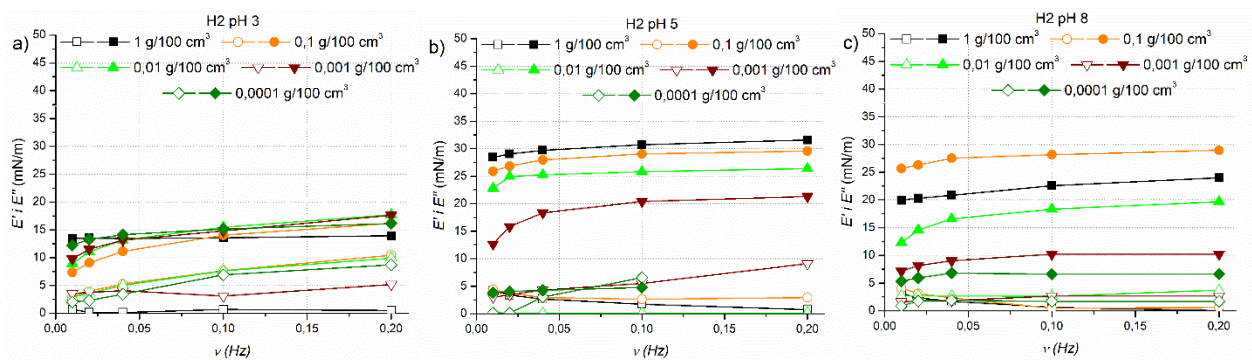
Jedna od glavnih odlika proteina kao površinski aktivnih molekula po kojoj se razlikuju od niskomolekularnih emulgatora jeste da proteini obrazuju viskoelastične adsorpcione filmove na granici faza (Dan i sar., 2013; Dickinson, 1999; Hoffmann i Reger, 2014; Sagis i Scholten, 2014). Viskoelastične osobine adsorpcionih filmova se mogu okarakterisati putem dilatacione elastičnosti, E' , i dilatacionog viskoziteta E'' , određenih računskim putem na osnovu merenja odgovora adsorpcionog filma na saopštene dilatacione oscilacije. Uticaj frekvencije oscilovanja na E' i E'' adsorpcionih filmova rastvora IPST, H1 i H2 na granici faza između rastvora proteina i ulja prikazan je na slici 29, 30 i 31, respektivno.



Slika 29. Uticaj frekvencije oscilovanja na dilatacionu elastičnost, E' (ispunjeni simboli), i dilatacioni viskozitet, E'' (prazni simboli), adsorpcionih filmova rastvora IPST različite koncentracije na a) pH 3, b) pH 5 i c) pH 8. $I_c=0 \text{ mol/dm}^3$.



Slika 30. Uticaj frekvencije oscilovanja na dilatacionu elastičnost, E' (ispunjeni simboli), i dilatacioni viskozitet, E'' (prazni simoboli), adsorpcionih filmova rastvira H1 različite koncentracije na a) pH 3, b) pH 5 i c) pH 8. $I_c=0 \text{ mol/dm}^3$.

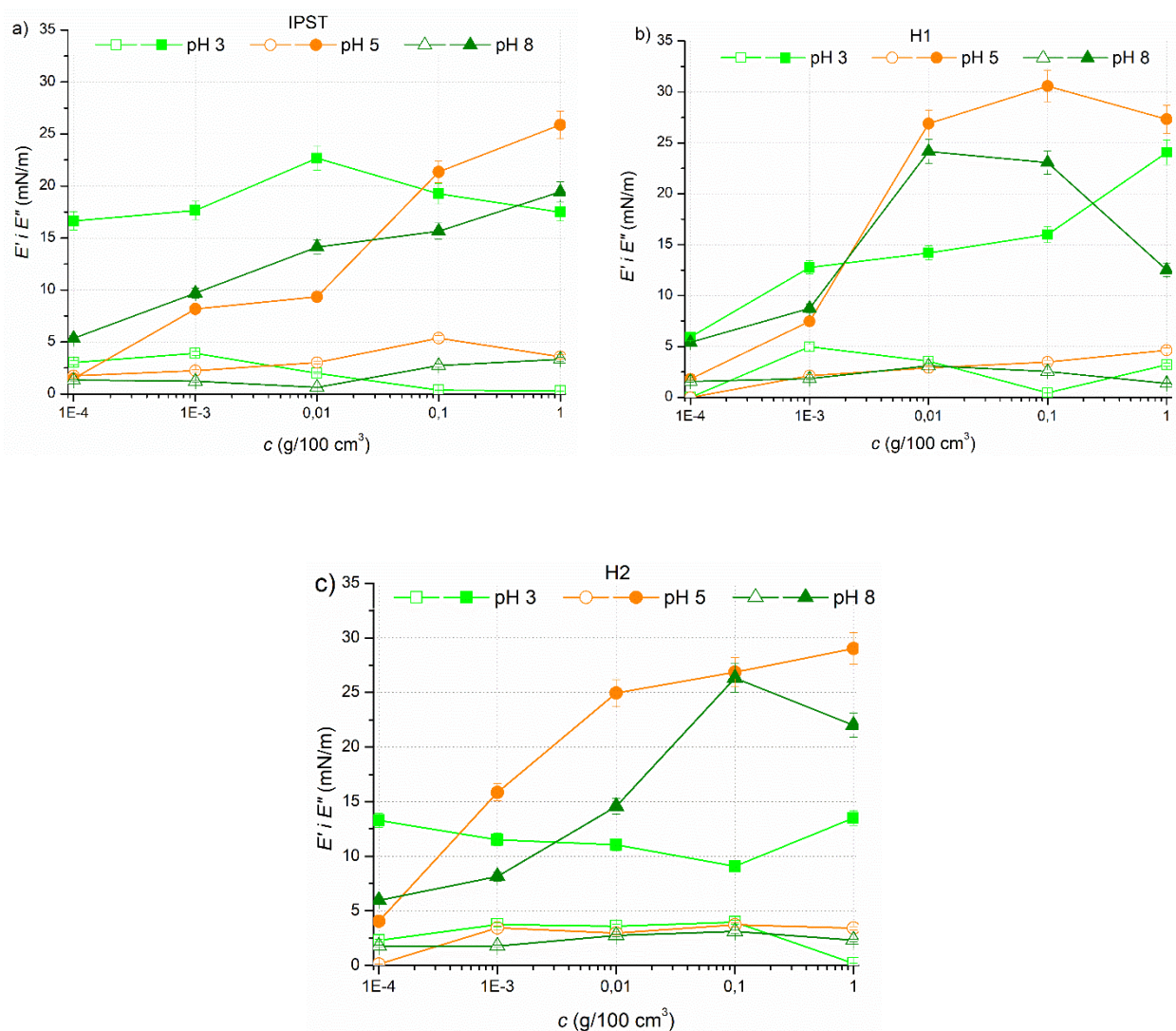


Slika 31. Uticaj frekvencije oscilovanja na dilatacionu elastičnost, E' (ispunjeni simboli), i dilatacioni viskozitet, E'' (prazni simoboli), adsorpcionih filmova rastvira H2 različite koncentracije na a) pH 3, b) pH 5 i c) pH 8. $I_c=0 \text{ mol/dm}^3$.

Dilataciona elastičnost adsorpcionih filmova IPST, H1 i H2 se povećava sa povećanjem frekvencije oscilovanja i teži ravnotežnom stanju bez obzira na pH vrednost rastvora. Uticaj frekvencije oscilovanja na E' se smanjuje sa povećanjem koncentracije rastvora: što je koncentracija proteinskog rastvora veća to je promena E' sa promenom frekvencije oscilovanja manja. Uticaj frekvencije oscilovanja na E'' je zanemarljiv pri koncentracijama rastvora proteina $c > 0,001 \text{ g/100 cm}^3$, sa izuzetkom adsorpcionih filmova

H2 na pH 3 kod kojih dolazi do povećanja E'' pri koncentracijama rastvora od 0,1 g/100 cm³, 0,01 g/100 cm³ i 0,0001 g/100 cm³. Slično ponašanje pokazuju i adsorpcioni filmovi IPST, H1 na pH 3 i pH 5 i H2 na pH 5 kada je koncentracija rastvora proteina $c \leq 0,001$ g/100 cm³. Uprkos tome, potrebno je naglasiti da je E'' svih uzoraka sa $c > 0,001$ g/100 cm³ značajno niži od E' za dati uzorak pri frekvencijama $\nu \geq 0,04$ Hz što je osobina koju IPST, H1 i H2 dele sa drugim biljnim proteinima, na primer: izolatom i hidrolizatom glicina (Ruíz-Henestrosa i sar., 2009), koncentratom proteina pirinča (Romero i sar., 2012), globulinima soje i redukovanim glicininom (Patino i sar., 2005) i proteinskim izolatom amaranta (Bolontrade i sar., 2016).

Uticaj koncentracije rastvora IPST, H1 i H2 na E' i E'' adsorpcionih filmova pri različitoj pH vrednosti rastvora proteina je prikazan na slici 32a, 32b i 32c, respektivno. Povećanjem koncentracije rastvora IPST, H1 i H2 povećava se i E' adsorpcionih filmova bez obzira na pH rastvora proteina, osim kod adsorpcionih filmova hidrolizata H2 na pH 3, gde E' praktično ne zavisi od koncentracije rastvora. Pored toga, E' adsorpcionih filmova IPST na pH 3, zatim H1 na pH 5 i oba hidrolizata, H1 i H2 na pH 8 raste sa povećanjem koncentracije za niže koncentracije rastvora, $c \leq 0,01$ g/100 cm³, nakon čega dalje opada. Ovakav rezultat je posledica razlike u površinskoj koncentraciji IPST, H1 i H2 pri različitim koncentracijama rastvora kao i konformacije molekula u zavisnosti od uslova sredine. Naime, k_{diff} je niža pri niskim koncentracijama rastvora proteina (tabela 3), što znači da se granica faza sporije popunjava adsorbovanim peptidima, pri čemu molekuli na granici faza podležu relaksacionim procesima i imaju više mogućnosti za ostvarivanje intermolekularnih veza. Sa druge strane, pri višim koncentracijama IPST, H1 i H2 rastvora, povećava se zasićenost granične površine molekulima – površina koju zauzima jedan molekul svedena je na minimum, te prisutni molekuli pri velikim koncentracijama ispoljavaju svojstva slična nesolvatisanim molekulima, što se manifestuje kroz smanjenu visko-elastičnost adsorpcionih filmova (Bos i Van Vliet, 2001; Jarpa-Parra i sar., 2015). Smanjenje E' pri koncentraciji $c > 0,1$ % na različitim pH vrednostima rastvora je zapaženo i kod proteina graška, krompira i Na-kazeinata (Amine i sar., 2014).



Slika 32. Uticaj koncentracije rastvora a) IPST, b) H1 i c) H2 na dilatacionu elastičnost, E' (ispunjeni simboli) i dilatacioni viskozitet, E'' (prazni simboli) adsorpcionih filmova na različitoj pH vrednosti rastvora. $I_c = 0 \text{ mol/dm}^3$, $\nu = 0,02 \text{ Hz}$.

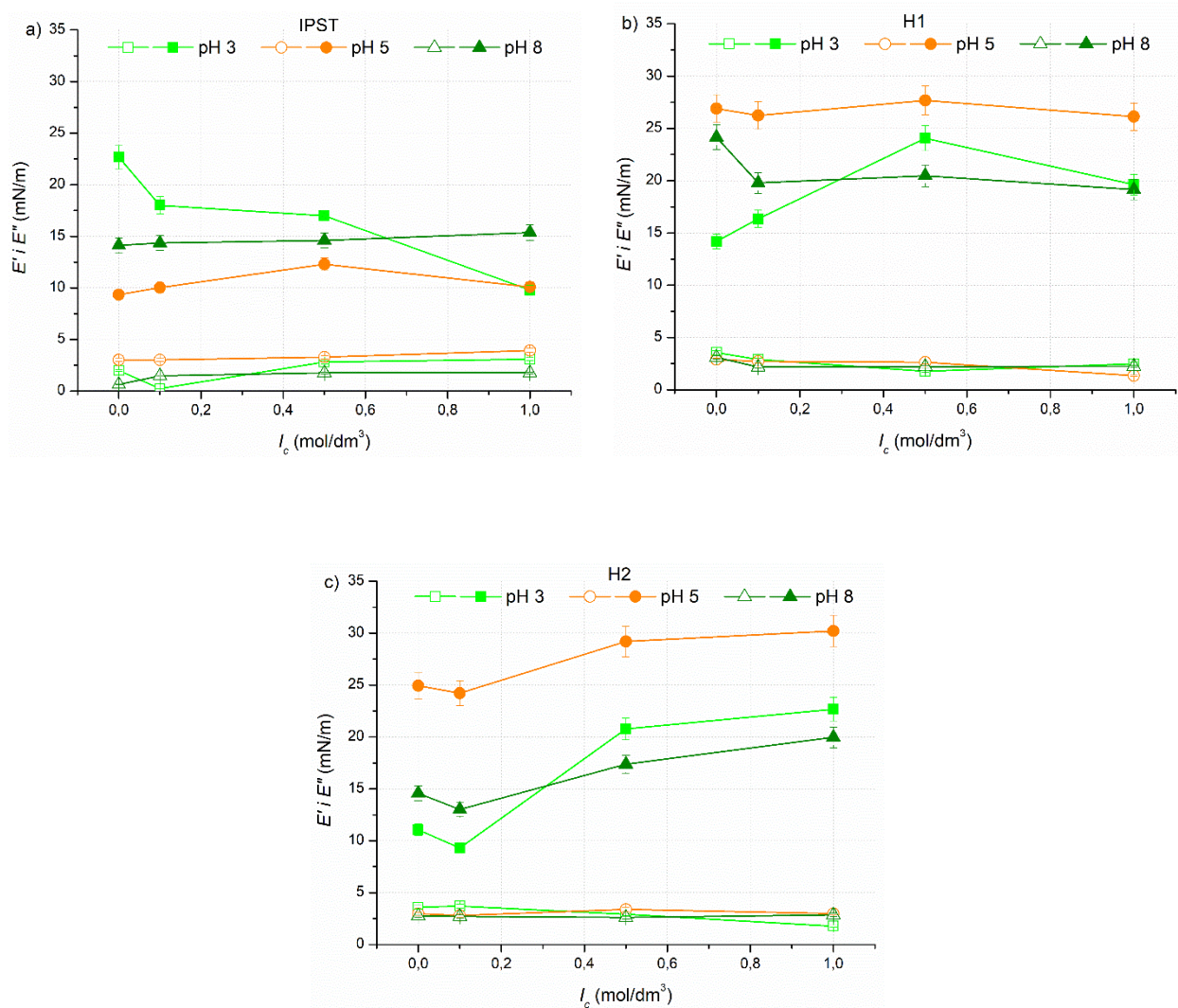
Na slici 32 se primećuje da je enzimskom hidrolizom IPST povećana E' adsorpcionih filmova na $\text{pH}=\text{pI}$, odnosno da adsorpcioni filmovi hidrolizata H1 pri $c \geq 0,01 \text{ g/100 cm}^3$ i hidrolizata H2 na svim koncentracijama imaju veću E' u poređenju sa E' adsorpcionih filmova IPST na $\text{pH}=5$. Veća E' adsorpcionih filmova modifikovanih

proteina u odnosu na E' adsorpcionih filmova nativnih proteina u izoelektričnoj tački je zapažena i kod hemijski redukovano i enzimski hidrolizovanog glicinina što je posledica razlike u koncentraciji i konformaciji adsorbovanih proteina na granici faza. Naime, niža površinska koncentracija nativnih proteina i njihova kompaktnija konformacija na $\text{pH}=\text{pI}$, u odnosu na $\text{pH}\neq\text{pI}$, ograničava intermolekularne interakcije. Sa druge strane, manja molekulska masa hidrolizovanih proteina doprinosi povećanju koncentracije adsorbovanih molekula na granici faza i njihovih međusobnih interakcija (Patino i sar., 2005; Ruíz-Henestrosa i sar., 2009).

Sa druge strane, uticaj povećanja koncentracije rastvora IPST, H1 i H2 na E'' adsorpcionih filmova je praktično zanemarljiv budući da su promene E'' nastale usled povećanja koncentracije manje od 5 mN/M na svim ispitivanim pH vrednostima (Slika 32).

Uticaj jonske jačine na E' i E'' adsorpcionih filmova IPST, H1 i H2 pri različitim pH vrednostima rastvora prikazan je na slici 33a, 33b i 33c, respektivno. Na slici 33a se može videti da povećanje jonske jačine rastvora IPST dovodi do snižavanja E' na pH 3 dok na ostalim pH vrednostima, pH 5 i pH 8, uzrokuje blago povećanjem E' . Povećanjem I_c do 0,5 mol/dm³ NaCl u rastvorima H1 i H2 dolazi do povećanja E' adsorpcionih filmova za oko 10 mN/m na pH 3 (Slika 33b i 33c), kao rezultat slabljenja odbojnih sila pri čemu dolazi do povećanja intermolekularnih interakcija. Na pH=5, uticaj dodatka NaCl na E' adsorpcionih filmova H1 i H2 je sličan dejstvu na rastvorljivost IPST, H1 i H2 (Slika 17a, 17b i 17c, respektivno), pri čemu povećanje I_c na pH 5 izaziva najmanje promene E' adsorpcionih filmova u odnosu na druge ispitivane pH vrednosti, pH 3 i pH 8.

Niže vrednosti E'' u odnosu na E' adsorpcionih filmova IPST, H1 i H2, bez obzira na pH i jonsku jačinu, ukazuju na dominaciju elastičnih osobina kod adsorpcionih filmova.

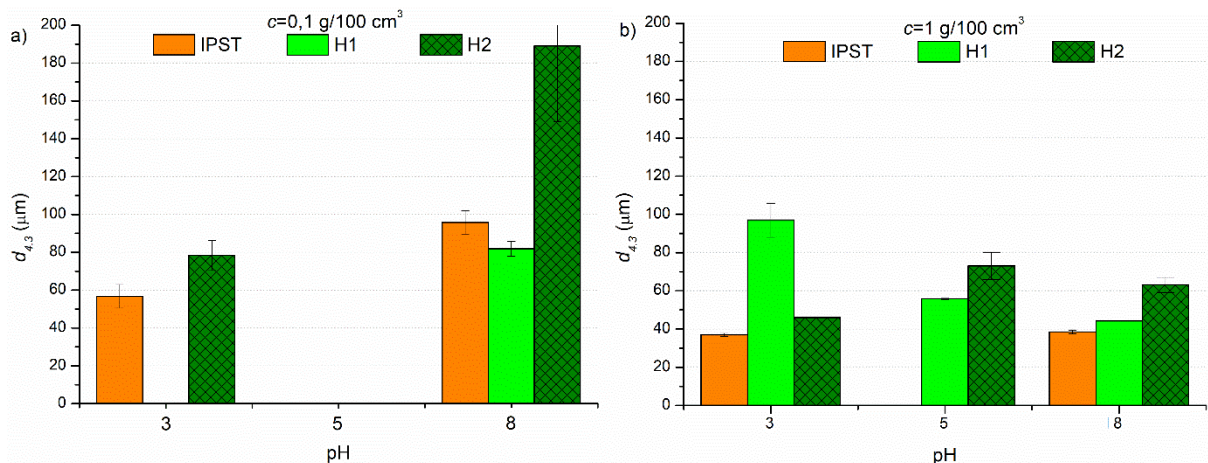


Slika 33. Uticaj jonske jačine na dilatacionu elastičnost, E' (ispunjeni simboli), i dilatacioni viskozitet, E'' (prazni simboli), adsorpcionih filmova rastvora a) IPST, b) H1 i c) H2 na pH 3, 5 i 8. $c=0,01$ g/100 cm³, $\nu=0,02$ Hz.

4.7. EMULZIONA SVOJSTVA

Emulziona svojstva IPST, H1 i H2 ispitana su pripremom 20% emulzija ulja u vodenoj fazi – rastvoru proteina, i okarakterisana se putem veličine, raspodele veličina kapljica i kringing indeksa. Ispitan je uticaj koncentracije rastvora IPST, H1 i H2, uticaj pH vrednosti (3, 5 i 8), jonske jačine sredine (0 mol/dm^3 i $0,5 \text{ mol/dm}^3$) i uslova homogenizovanja, odnosno, uticaj broja obrtaja turbine homogenizera (10000 o/min i 24000 o/min).

Na slici 34a i 34b prikazan je uticaj pH vrednosti kontinualne faze na prosečan prečnik kapljica, $d_{4,3}$, emulzija stabilizovanih IPST, H1 i H2, pri koncentraciji proteina u kontinualnoj fazi od $c=0,1 \text{ g/100 cm}^3$ i $c=1 \text{ g/100 cm}^3$, respektivno. Pri koncentraciji rastvora IPST i H2 od $0,1 \text{ g/100 cm}^3$ u kontinualnoj fazi stabilne emulzije dobijene su na pH 3 i pH 8, dok u slučaju hidrolizata H1 stabilna emulzija formirana je samo na pH=8. Kod ostalih emulzija progresivna koalescencija kapljica dovela je do potpune separacije faza, uprkos činjenici da su sva tri proteina, IPST, H1 i H2, površinski aktivna i formiraju adsorpcione filmove bez obzira na pH vrednost rastvora (Slika 21).



Slika 34. Uticaj pH na prosečan prečnik kapljica emulzija stabilizovanih IPST, H1 i H2 sa a) $0,1 \text{ g/100 cm}^3$ i b) 1 g/100 cm^3 proteina u kontinualnoj fazi. $I_c=0 \text{ mol/dm}^3$.

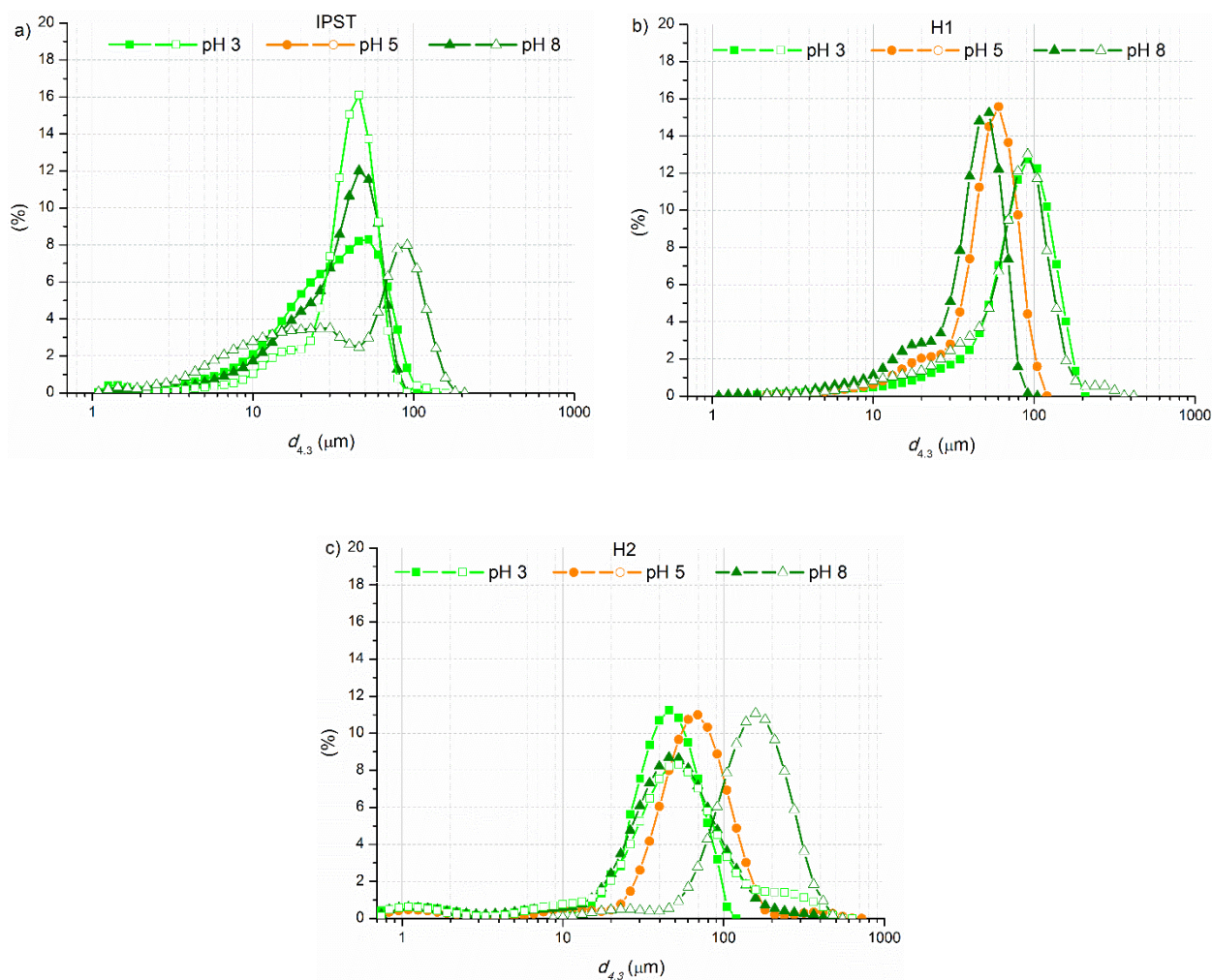
Upoređivanjem prosečnog prečnika kapljica emulzija sa različitom koncentracijom rastvora IPST, H1 i H2 u kontinualnoj fazi primećuje se da je povećanje koncentracije rastvora proteina dovelo do smanjenja prosečnog prečnika kapljica (Slika 34a i 34b). Dakle, veličina kapljica u emulzijama u ovom slučaju ne zavisi od saopštene energije u toku homogenizacije već isključivo od koncentracije rastvora IPST, H1 i H2 (McClements i Jafari, 2018; Ozturk i McClements, 2016). U emulzijama sa koncentracijom proteina od $0,1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ u kontinualnoj fazi nema dovoljno proteina da bi se pokrila površina kapi nastalih tokom homogenizovanja, te je veličina kapi određena isključivo maksimalnom površinom koja može biti pokrivena prisutnim molekulima proteina (McClements, 2004b).

Emulgovanjem ulja u rastvorima IPST, H1 i H2 koncentracije $1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ dobijene su stabilne emulzije bez obzira na pH vrednost rastvora, osim u slučaju IPST na pH 5 kada je došlo do raslojavanja emulzije, odnosno, do razrušavanja emulzije (Slika 34b). Slaba emulgujuća svojstva biljnih proteina na pH u blizini izoelektrične tačke su posledica slabog naelektrisanja proteina koje omogućava agregaciju i koalescenciju kapljica kao posledicu slabog elektrostatičkog odbijanja emulgovanih kapljica (Joshi i sar., 2012; Lam i Nickerson, 2013).

Pri koncentraciji proteina u kontinualnoj fazi od $1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ oba hidrolizata stabilizovala su kapljice emulzija bez obzira na pH (Slika 34b), uprkos minimalnoj vrednosti zeta potencijala H1 na pH 5 i H2 na pH 5 i pH 8 (Slika 15), što ukazuje na to da pored naelektrisanja molekula, stabilnosti emulzija doprinosi i smanjenje molekulske mase usled enzimske hidrolize. Takvo ponašanje je posledica enzimske hidrolize kojom nastaju peptidi kod kojih postoji veća verovatnoća da su hidrofobne i hidrofilne grupe, koje su u nativnom proteinu bile sakrivene unutar njegove strukture, postale dostupne za ostvarivanje intermolekularnih veza. Tokom homogenizacije emulzija te iste grupe lakše nalaze najpovoljniju orijentaciju na granici faza ulja i vode, doprinose dilatacionoj elastičnosti adsorpcionog filma (Slika 32), a samim tim, i povećanju efekta sterne stabilizacije (Adjonu i sar., 2014a).

Raspodela veličina kapljica u emulzijama sa $0,1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ i $1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ IPST, H1 i H2 u kontinualnoj fazi na različitim pH vrednostima prikazana je na slici 35a, 35b i 35c.

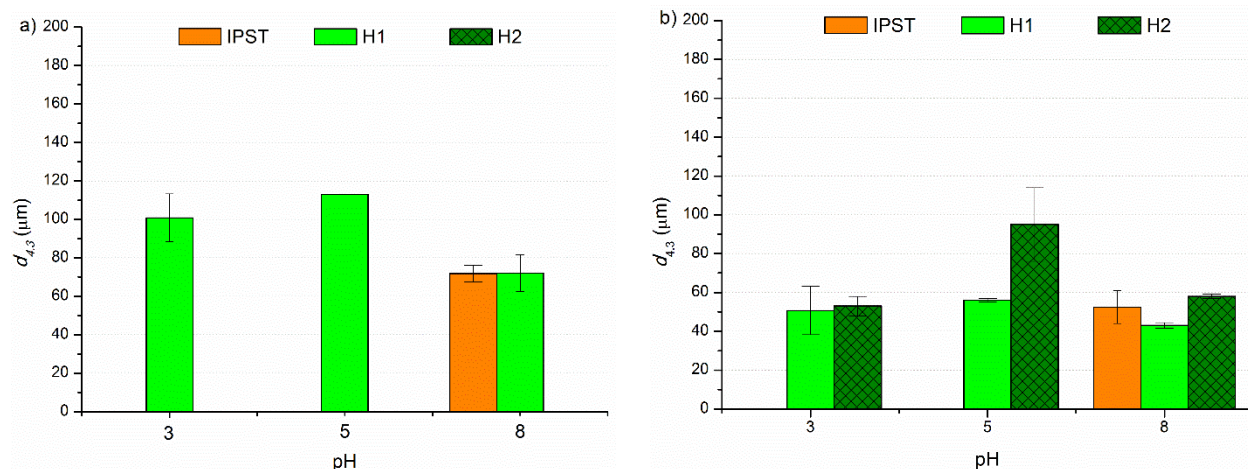
Monomodalna raspodela veličina prečnika kapljica se primećuje u emulzijama stabilizovanim sa IPST na pH 3 i pH 5 i kod H1 svim ispitivanim pH vrednostima, dok se kod svih ostalih stabilnih emulzija (IPST na pH 8 i emulzije stabilizovane hidrolizatom H2 bez obzira na pH) zapaža bimodalna raspodela veličina kapljica što može da ukazuje na odvijanje nekih od mehanizama nestabilnosti kao što su koalescencija i flokulacija kapljica (Ushikubo i Cunha, 2014).



Slika 35. Raspodela veličina kapljica emulzija sa $0,1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ (prazni simboli) i $1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ (ispunjeni simboli) a) IPST, b) H1 i c) H2 na različitim pH. $I_c = 0 \text{ mol}/\text{dm}^3$.

Takođe, primećuje se, slika 35, da je maksimum raspodele, tj. najverovatniji prečnik kapljica, kod emulzija sa manjom koncentracijom proteina pomeren u desno u odnosu na maksimum raspodele veličine kapljica emulzija sa koncentracijom proteina od $1 \text{ g}/100\text{cm}^3$ u kontinualnoj fazi.

Na slici 36 prikazan je uticaj pH vrednosti na prosečan prečnik kapljica, $d_{4,3}$, emulzija sa povećanom jonskom jačinom, $I_c=0,5\text{mol}/\text{dm}^3$, pri različitoj koncentraciji rastvora IPST, H1 i H2 u kontinualnoj fazi ($0,1 \text{ g}/100\text{cm}^3$ i $1 \text{ g}/100\text{cm}^3$). Pri povećanoj jonskoj jačini dobijene su stabilne emulzije stabilizovane hidrolizatom H1, bez obzira na koncentraciju proteina i pH vrednost kontinualne faze. Hidrolizat H2 je takođe stabilizovao emulzije na sve tri ispitivane pH vrednosti, međutim, samo pri većoj koncentraciji rastvora proteina, $c=1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$. Sa druge strane, stabilne emulzije IPST, pri povećanoj jonskoj jačini, su dobijene samo na $\text{pH}=8$, na obe ispitivane koncentracije rastvora proteina.

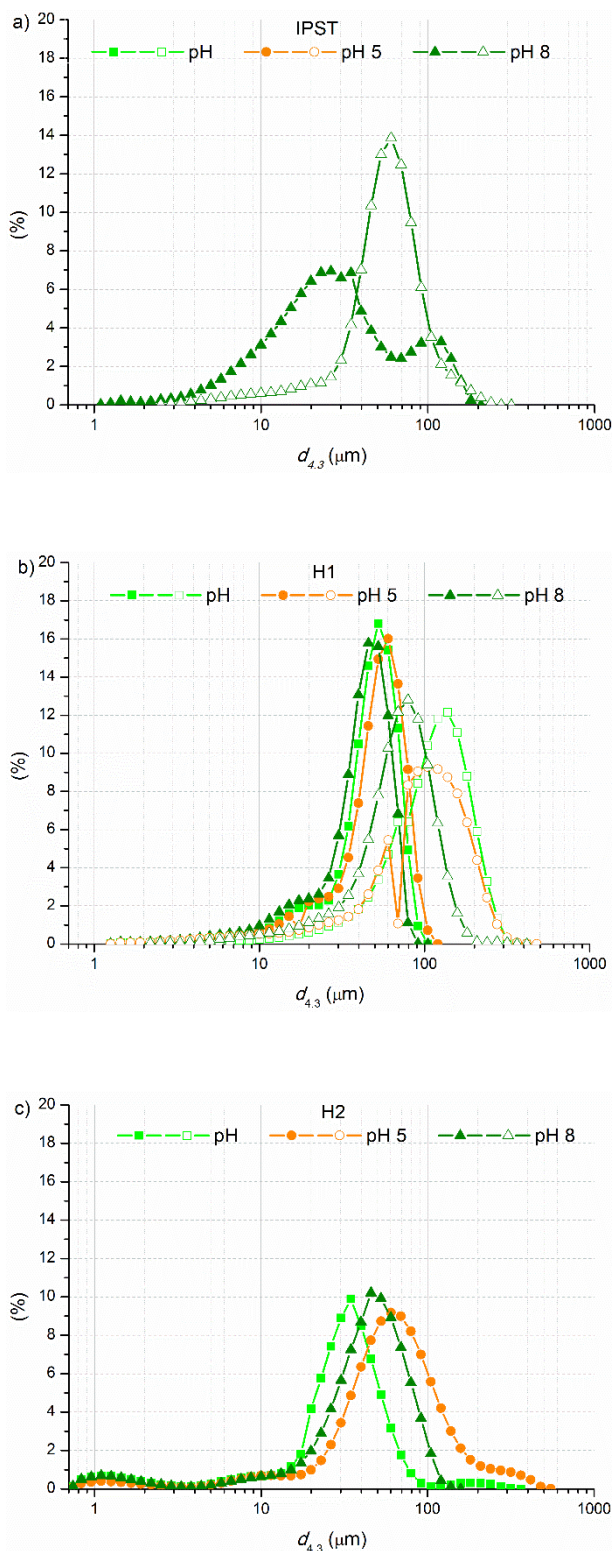


Slika 36. Uticaj pH na prosečan prečnik kapljica emulzija IPST, H1 i H2 sa a) $0,1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ i b) $1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ proteina u kontinualnoj fazi i jonskom jačinom, $I_c= 0,5 \text{ mol}/\text{dm}^3$.

Pri $I_c=0,5 \text{ mol/dm}^3$ NaCl nestabilne emulzije su dobijene emulgovanjem ulja u rastvorima IPST na pH 3 i pH 5, bez obzira na koncentraciju rastvora i u rastvorima H2 pri nižoj koncentraciji rastvora proteina na pH 3, pH 5 i pH 8, kada je odmah nakon homogenizovanja došlo do izdvajanja uljne faze.

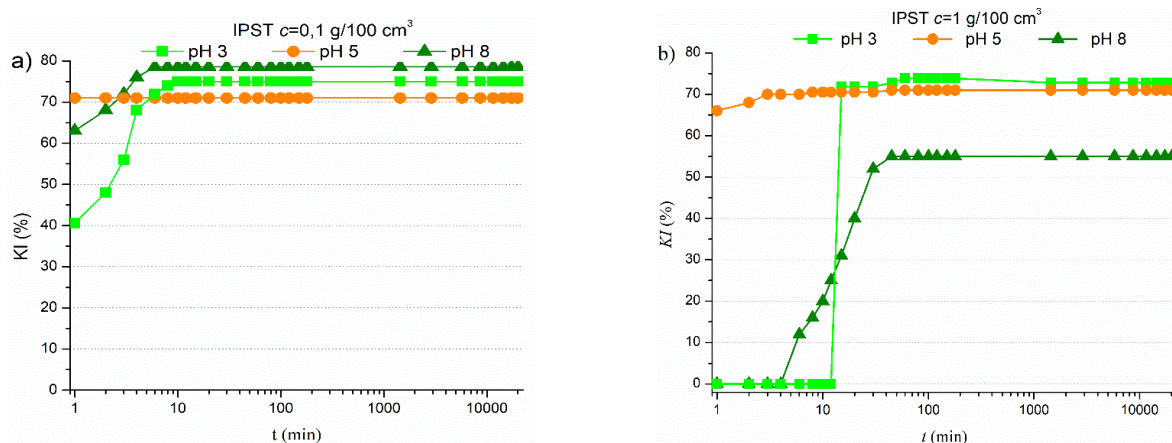
Upoređivanjem prosečnih prečnika kapljica odgovarajućih emulzija sa $I_c=0 \text{ mol/dm}^3$, slika 34, i $I_c=0,5 \text{ mol/dm}^3$ NaCl, slika 36, primećuje se da je usled povećanja I_c smanjen prosečan prečnik kapljica u emulzijama stabilizovanim IPST na pH 8 pri $c=0,1 \text{ g/100 cm}^3$ kao i u emulzijama stabilizovanim hidrolizatom H1 na pH 3 i pH 5 pri $c=0,1 \text{ g/100 cm}^3$ i na pH 3 pri $c=1 \text{ g/100 cm}^3$. Uticaj povećanja I_c na stabilnost emulzija i na njihov prosečan prečnik kapljica je rezultat kombinacije uticaja koje povećanje I_c ima na rastvorljivost, zeta potencijal i površinski pritisak rastvora IPST, H1 i H2, kao i na dilatacionu elastičnost njihovih adsorpcionih filmova.

Raspodela veličina kapljica u emulzijama sa $I_c=0,5 \text{ mol/dm}^3$ NaCl pri različitoj koncentraciji IPST, H1 i H2 i različitim pH vrednostima prikazana je na slici 37a, 37b i 37c. Monomodalna raspodela prečnika kapljica zapaža se kod emulzija stabilizovanih sa IPST i H1 bez obzira na koncentraciju i pH vrednost kontinualne faze, izuzev emulzije stabilizovane IPST pri koncentraciji od 1 g/100 cm^3 u kontinualnoj fazi na pH 8 koja ima bimodalnu raspodelu. Pored toga, bimodalna raspodela veličina kapljica se primećuje i kod svih emulzija stabilizovanih hidrolizatom H2. Najverovatniji prečnik kapljica emulzija sa manjom koncentracijom rastvora proteina ($c=0,1 \text{ g/100 cm}^3$), slika 37, smaknut ka većim prečnicima kapljica u odnosu na najverovatniji prečnik kapljica emulzija sa većom koncentracijom rastvora proteina.

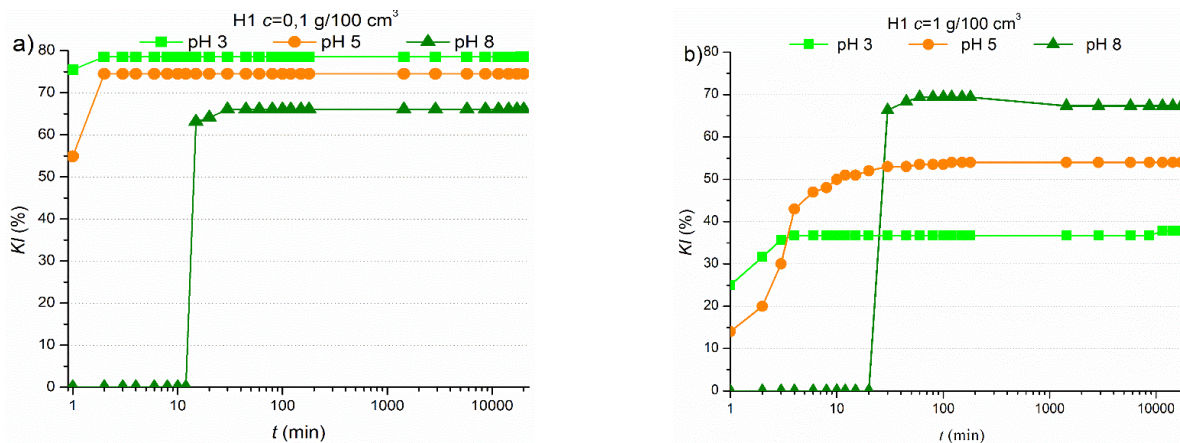


Slika 37. Raspodela veličina kapljica emulzija a) IPST, b) H1 i c) H2 sa povećanom jonskom jačinom, $I_c=0,5 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$ pri $c=0,1 \text{ g/100 cm}^3$ (prazni simboli) i $c=1 \text{ g/100 cm}^3$ (ispunjeni simboli) na pH 3, 5 i 8.

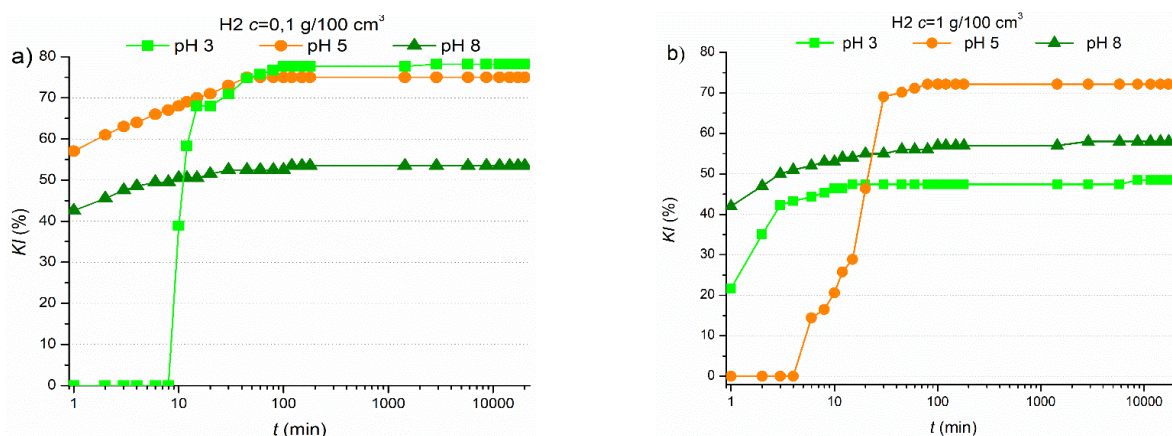
Kriming indeks, KI , emulzija sa $0,1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ i $1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ IPST, H1 i H2 u kontinualnoj fazi u zavisnost od pH vrednosti prikazan je na slikama 38, 39 i 40, respektivno. Primećuje se da kod svih ispitivanih emulzija kriming indeks raste sa vremenom usled razdvajanja emulzija na dva dela: krem – bogat kapljicama ulja, i donji sloj – serum, bogat kontinualnom fazom. KI dostiže plato već nakon tridesetak minuta što ukazuje na izrazitu gravitacionu nestabilnost do koje dolazi usled prisustva relativno velikih kapljica u emulzijama i niskog viskoziteta kontinualne faze (Petrović i sar., 2010).



Slika 38. Kriming indeks emulzija stabilizovanih IPST sa a) $c=0,1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ i b) $c=1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ na tri različite pH vrednosti (3, 5 i 8). $I_c=0 \text{ mol}/\text{dm}^3$.

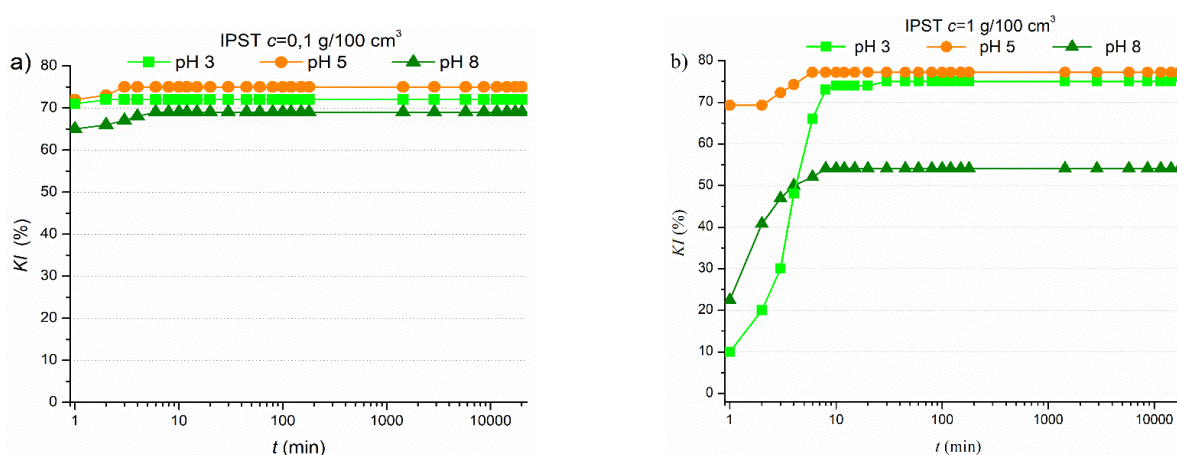


Slika 39. Kriming indeks emulzija stabilizovanih H1 sa a) $c=0,1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ i b) $c=1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ na tri različite pH vrednosti (3, 5 i 8). $I_c=0 \text{ mol}/\text{dm}^3$.

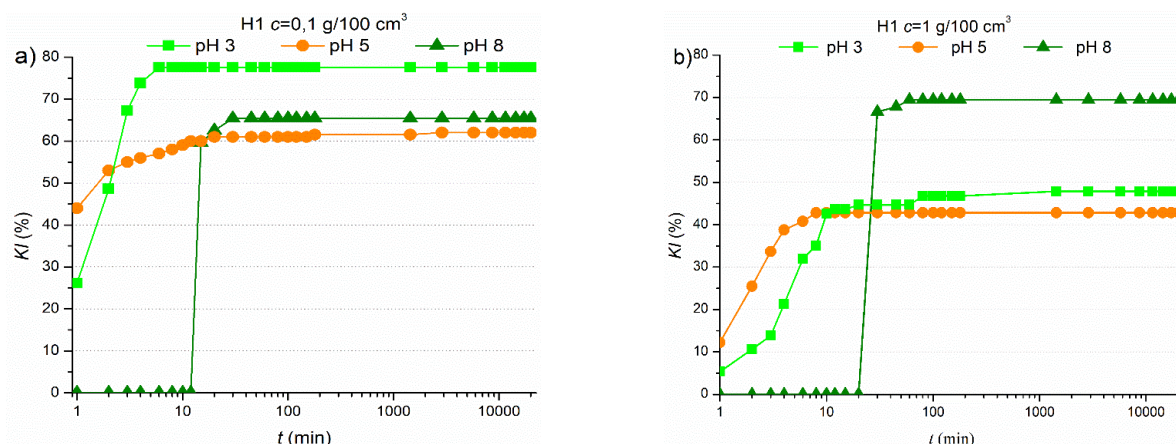


Slika 40. Kriming indeks emulzija stabilizovanih H2 sa a) $c=0,1 \text{ g/100 cm}^3$ i b) $c=1 \text{ g/100 cm}^3$ na tri različite pH vrednosti (3, 5 i 8). $I_c=0 \text{ mol/dm}^3$.

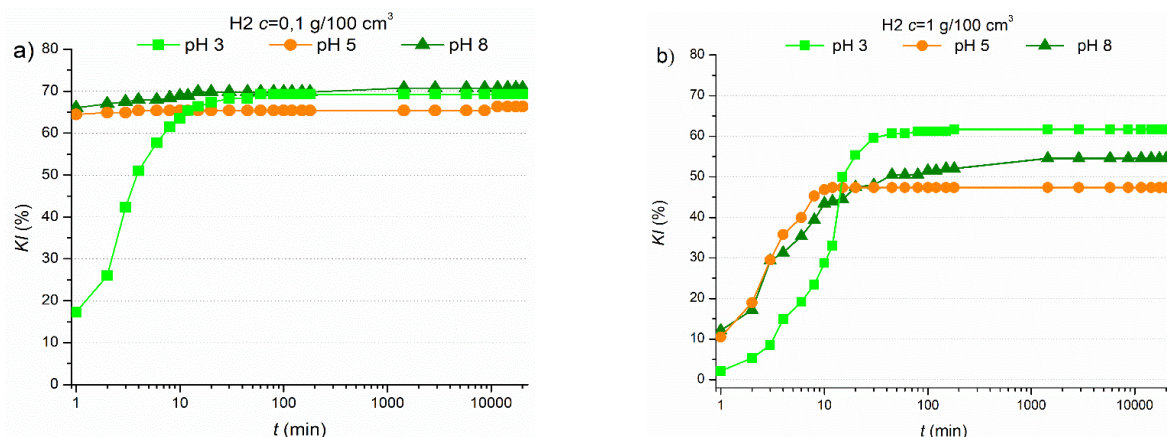
Slike 41, 42 i 43 prikazuju kriming indeks emulzija sa jonskom jačinom, $I_c=0,5 \text{ mol/dm}^3$ NaCl, stabilizovanih IPST, H1 i H2, respektivno, pri različitoj koncentraciji rastvora proteina na tri pH vrednosti (3, 5 i 8).



Slika 41. Kriming indeks emulzija stabilizovanih IPST sa a) $c=0,1 \text{ g/100 cm}^3$ i b) $c=1 \text{ g/100 cm}^3$ pri $I_c=0,5 \text{ mol/dm}^3$ NaCl na tri različite pH vrednosti (3, 5 i 8).



Slika 42. Kriming indeks emulzija stabilizovanih H1 sa a) $c=0,1 \text{ g/100 cm}^3$ i b) $c=1 \text{ g/100 cm}^3$ pri $I_c=0,5 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$ na tri različite pH vrednosti (3, 5 i 8).

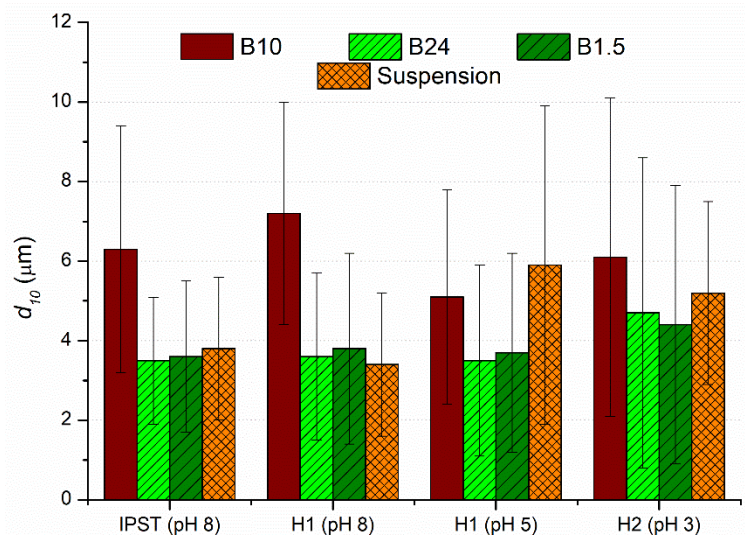


Slika 43. Kriming indeks emulzija stabilizovanih H2 sa a) $c=0,1 \text{ g/100 cm}^3$ i b) $c=1 \text{ g/100 cm}^3$ pri $I_c=0,5 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$ na tri različite pH vrednosti (3, 5 i 8).

Sa slika 41–43 se može uočiti da se KI emulzija sa povećanom I_c postepeno povećava u toku vremena dostižući plato već nakon maksimalno 20 minuta. Sa druge strane, KI kod izrazito nestabilnih emulzija kod kojih je došlo do izdvajanja ulja, odnosno kod emulzija sa $c=0,1 \text{ g/100 cm}^3$ stabilizovanih IPST, na svim ispitivanim pH

vrednostima i emulzija stabilizovanih H2 na pH 5 i pH 8, takođe sa $c=0,1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$, je dostigao plato već nakon par minuta.

Na osnovu sprovedenih ispitivanja uticaja koncentracije, pH vrednosti i jonske jačine rastvora IPST, H1 i H2 na sposobnost emulgovanja suncokretovog ulja, ustanovljeno je da u emulzijama sa kontinualnom fazom jonske jačine $I_c=0,5 \text{ mol}/\text{dm}^3$ NaCl najmanji prosečan prečnik kapljica dobijen sa IPST na pH 8, H1 na pH 8 i pH 5 i H2 na pH 3. Prema tome, kontinualne faze spomenutog sastava su odabrane za ispitivanje uticaja uslova homogenizacije (pogledati poglavlje 3.2.13.) na osobine emulzija. Pripremljene su 20% emulzije suncokretovog ulja u četiri različite kontinualne faze. Brojčani prosečan prečnik kapljica, d_{10} , u emulzijama sa četiri izabrane kontinualne faze prikazan je na slici 44. Prosečan prečnik kapljica emulzija se smanjuje sa povećanjem brzine broja obrtaja homogenizera sa 10000 o/min (emulzija B10) na 24000 o/min (emulzija B24).



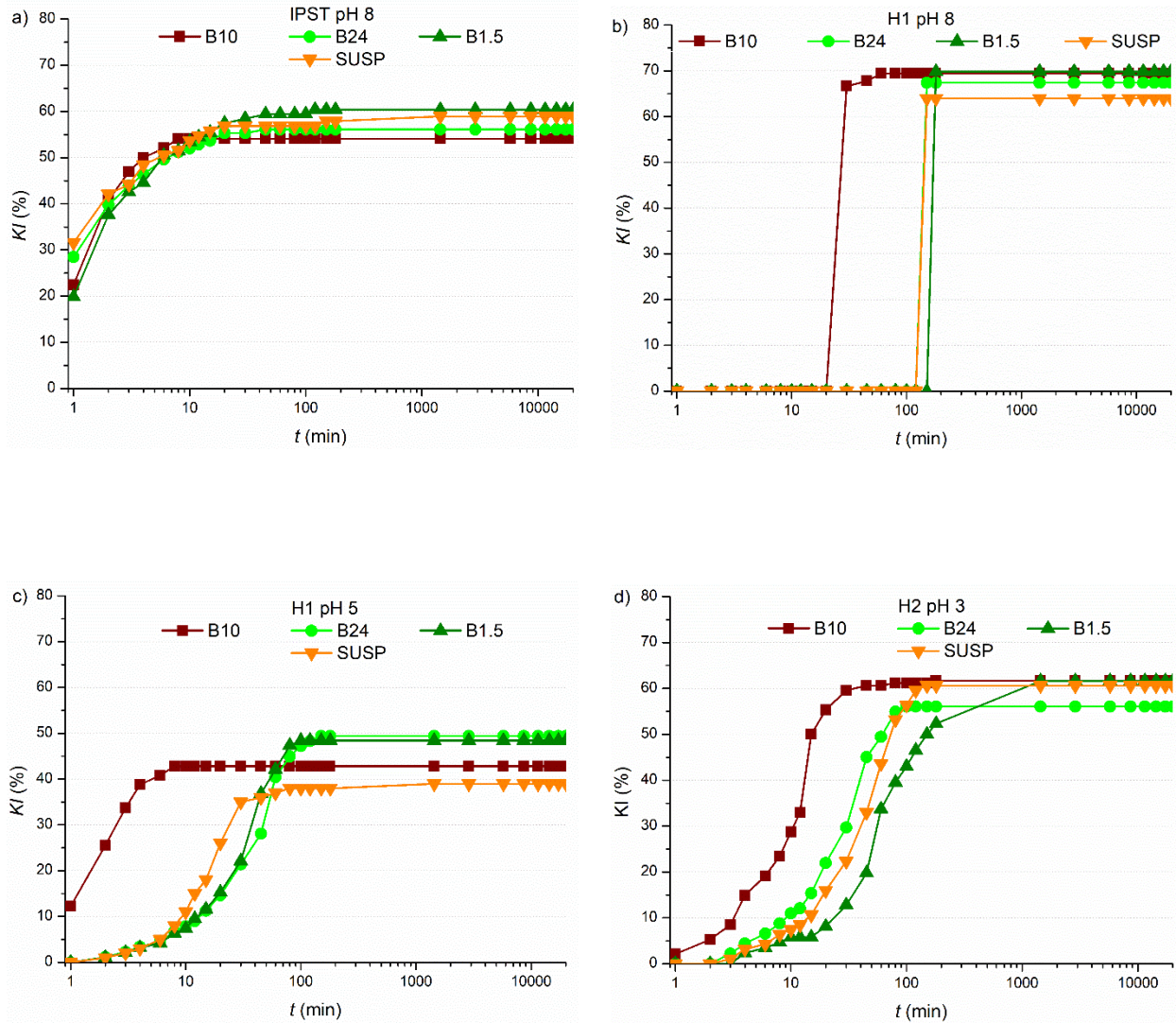
Slika 44. Prosečan prečnik kapljica, d_{10} , emulzija stabilizovanih IPST na pH 8, H1 na pH 8 i pH 5 i H2 na pH 3, pripremljenih pri različitim uslovima. $I_c=0,5 \text{ mol}/\text{dm}^3$.

Sa druge strane, povećanje koncentracije rastvora IPST, H1 i H2 sa 1 g/100 cm³ (B24) na 1,5 g/100 cm³ (B1,5) praktično ne utiče na d_{10} sugerišući da granica faza nastala tokom homogenizovanja u potpunosti pokrivena molekulima IPST, H1 i H2, već pri koncentraciji 1 g/100 cm³ usled čega je veličina kapljica relativno nezavisna od daljeg povećanja koncentracije emulgatora i primarno zavisi od količine utrošene energije tokom homogenizacije (McClements, 2004a).

Ispitana je mogućnost emulgovanja suncokretovog ulja u suspenzijama praha IPST, H1 i H2. Utvrđeno je da emulgovanje suncokretovog ulja u suspenzijama IPST, H1 i H2 (SUSP emulzije) minimalno utiče na prosečan prečnik kapi u poređenju sa odgovarajućim emulzijama suncokretovog ulja u rastvorima IPST, H1 i H2 (B24), sa izuzetkom emulzije H1 na pH 5 gde dolazi do povećanja prosečnog prečnika kapljica sa 3,5 μm (B24) na 7,3 μm (SUSP) (Slika 44).

Na slici 45 prikazan je kriming indeks B10, B24, B1,5 i SUSP emulzija a) IPST na pH 8, b) H1 na pH 8, c) H1 na pH 5 i d) H2 na pH 3.

Kriming indeks emulzija B10, B24, B1,5 i SUSP raste sa vremenom do dostizanja platoa. U slučaju emulzija sa kontinualnom fazom IPST na pH 8, različiti uslovi homogenizovanja kao i koncentracije rastvora IPST imaju zanemarljiv uticaj na povećanje *KI* (slika 45a). Sa druge strane, može se zapaziti da je dostizanje platoa *KI* emulzija B24 i SUSP sa kontinualnom fazom H1 na pH 8 i emulzijama B24, B1,5 i SUSP sa kontinualnim fazama H1 na pH 5 i H2 na pH 3 odloženo za više od 30 minuta u poređenju sa dostizanjem platoa *KI* emulzija B10, odnosno, do njihovog raslojavanja dolazi nakon stotinak minuta.



Slika 45. Kriming indeks B10, B24, B1,5 i SUSP emulzija a) IPST na pH 8, b) H1 na pH 8, c) H1 na pH 5 i d) H2 na pH 3. $I_c=0,5 \text{ mol/dm}^3$.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije okarakterisani su izolat proteina semena tikve (*Cucurbita pepo*), IPST, i njegova dva enzimska hidrolizata, H1 i H2, uz poseban akcenat na njihovim adsorpcionim i emulgujućim svojstvima koja ovoj disertaciji daju posebnu vrednosti i originalnost, budući da su ispitivanja adsorpcionih osobina izolata i hidrolizata semena tikve kao i ispitivanja reoloških osobina njihovih adsorpcionih filmova rađena po prvi put. Dodatno tome, specifičnost ovog istraživanja je i to što se sva ispitivanja koloidnih osobina izvedena pri realnim uslovima (povećana jonska jačina, priprema 20% emulzija) što značajno doprinosi sagledavanju mogućnosti korišćenja datih proteina u realnim proizvodima. Na osnovu rezultata ispitivanja izvedeni su sledeći zaključci:

- I Ispitivanjem sadržaja proteina, pepela i vlage utvrđeno je da sva tri uzorka, IPST, H1 i H2, imaju visok sadržaj proteina od $84,87 \pm 2\%$, $89,39 \pm 2,1\%$ i $92,13 \pm 1,7\%$, respektivno. H1 ima duplo viši sadržaj pepela (5,38%) od IPST i H2 (2,48% i 2,13%, respektivno) kao posledicu podešavanja pH vrednosti tokom pripreme uzorka puferom, za razliku od podešavanja pH rastvorom baze ili kiseline, dok IPST ima nešto viši sadržaj vlage (8,59%) u odnosu na hidrolizate H1 i H2 (5,21% i 5,78%, respektivno) usled sušenja na najnižoj temperaturi.
- II Utvrđeno je da je prinos oba hidrolizata, koji iznosi $19,3 \pm 0,6\%$ za H1 i $15,9 \pm 1,0\%$ za H2, manji od prinosa IPST ($36,5 \pm 0,2\%$) za više od 45%. Drastično umanjen prinos je rezultat slabe rastvorljivosti IPST, kao početnog materijala za enzimsku hidrolizu, pri uslovima pod kojima se odvija enzimska hidroliza.

- III Enzimskom hidrolizom IPST značajno se povećava rastvorljivost proteina. H1 i H2 imaju veću rastvorljivost u odnosu na IPST bez obzira na pH vrednost, a posebno u pH oblasti bliskoj izoelektričnoj tački IPST, $pI=5$. Pored toga, uticaj pH vrednosti na rastvorljivost je znatno manji kod H1 i H2 u odnosu na IPST.
- IV Povećanje jonske jačine je izazvalo *salting-in* i *salting-out* efekat kod svih uzoraka IPST, H1 i H2, u zavisnosti od pH rastvora. *Salting-out* je najmanje izražen u slučaju hidrolizata H2.
- V Ispitivanjem adsorpcionih svojstava proteinskog izolata i hidrolizata semena tikve (*Cucurbita pepo*), utvrđeno je da svi uzorci povećavaju površinski i međupovršinski pritisak pri koncentraciji $c \geq 0,001 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$, što ukazuje na to da se IPST, H1 i H2 adsorbuju na granicu faza ulje/voda i vazduh/voda bez obzira na pH vrednost i jonsku jačinu sredine. Površinski/međupovršinski pritisak H1 i H2 je manje zavistan od promene pH i jonske jačine rastvora u poređenju sa površinskim/međupovršinskim pritiskom IPST.
- VI Povećanjem koncentracije rastvora IPST, H1 i H2, u ispitivanom opsegu, povećava se površinski i međupovršinski pritisak što ukazuje na povećanje koncentracije adsorbovanih proteina na granici faza.
- VII Određivanjem parametara kinetike adsorpcije ustanovljeno je da konstanta brzine difuzije, k_{diff} , IPST, H1 i H2 raste sa povećanjem koncentracije rastvora proteina na sve tri ispitivane pH vrednosti (3, 5 i 8) pri čemu se najniže vrednosti u okviru jednog uzorka na određenoj koncentraciji dobijaju na $pH=5$. Veće vrednosti k_{diff} kod oba hidrolizata u odnosu na k_{diff} IPST ukazuju na to da je enzimska modifikacija IPST doprinela povećanju brzine difuzije H1 i H2 molekula u odnosu na molekule IPST, uprkos činjenici da je uticaj pH vrednosti rastvora ostao prisutan i nakon enzimske hidrolize IPST.

- VIII k_{diff} svih uzoraka opada sa povećanjem jonske jačine, sa izuzetkom IPST i H1 na pH 5 gde je uticaj dodatka NaCl na k_{diff} mali, što je posledica činjenice da je proteinska struktura na pH=5 već zbijena, te dodatak NaCl ne dovodi do značajnijih promena u strukturi koje bi se kasnije odrazile na k_{diff} .
- IX Dilataciona elastičnost adsorpcionih filmova IPST, H1 i H2 zavisi od pH vrednosti i koncentracije uzoraka, dok pomenuti uslovi imaju mali uticaj na dilatacioni viskozitet. Dilatacioni viskozitet je pri koncentraciji proteina $c \geq 0,001 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$, na svim ispitanim pH i jonskim jačinama rastvora, nekoliko puta manji od dilatacione elastičnosti, što ukazuje na dominantno elastični karakter proteinskih adsorpcionih filmova na granici faza ulje/voda.
- X Enzimskom hidrolizom IPST povećana je dilataciona elastičnost proteinskih adsorpcionih filmova na pH=pI, pri čemu hidrolizat H1 ima veću dilatacionu elastičnost od IPST pri koncentracijama većim od $0,001 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$, a hidrolizat H2 pri svim ispitanim koncentracijama.
- XI Utvrđeno je da sva tri uzorka proteina semena tikve, IPST, H1 i H2, imaju sposobnost emulgovanja trigliceridnih ulja. Emulgujuća svojstva IPST, H1 i H2 zavise od koncentracije uzorka, pH i jonske jačine kontinualne faze.
- XII Povećanje koncentracije IPST, H1 i H2 do $1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ dovodi do smanjenja veličine emulgovanih kapi. Pri koncentraciji $\geq 1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ površina kapljica je zasićena molekulima proteina, a prosečan prečnik kapljica primarno zavisi od utrošene energije za homogenizaciju, odnosno od broja obrtaja turbine tokom homogenizacije.
- XIII Pri koncentraciji od $1 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ ispitivani proteini sementa tikve su stabilizovali emulzije na svim pH osim IPST na pH 5, uprkos činjenici da

u izoelektričnoj tački IPST elektrostatičke odbojne sile nisu dovoljno jake da obezbede integritet kapljica nastalih emulgovanjem. Međutim, naelektrisanje proteina nije jedini faktor koji određuje stabilnost emulzija, budući da su oba hidrolizata, H1 i H2, uspešno stabilizovala emulgovane kapljice bez obzira na pH vrednost, uprkos niskom zeta potencijalu, sugerišući da je veća dilataciona elastičnost H1 i H2 na pH 5 od dilatacione elastičnost IPST zaslužna za stabilizaciju kapljica putem sternih efekata.

- XIV Homogenizovanjem ulja u rastvoru ispitivanih proteina, IPST, H1 i H2, pri povećanoj jonskoj jačini, IPST je uspešno stabilizovao kapi emulzije samo na pH 8, bez obzira na koncentraciju proteina u rastvoru. Sa druge strane, u slučaju hidrolizata H1 dobijene su stabilne emulzije na svim ispitivanim pH vrednostima (3, 5 i 8) i na obe ispitivane koncentracije, 0,1 g/100 cm³ i 1 g/100 cm³ dok je hidrolizat H2 takođe stabilizovao emulzije na svim ispitivanim pH vrednostima, ali samo pri većoj koncentraciji proteina, odnosno pri $c=1$ g/100 cm³.
- XV Sve emulzije su podlegle gravitacionoj nestabilnosti pri čemu se u gornjem sloju emulzije formira sloj bogat emulgovanim kapljicama – krem, a u donjem delu sloj siromašan emulgovanim kapljicama – serum.

6. LITERATURA

- Achouri, A., Nail, V., Boye, J.I., 2012. Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure and functional properties. *Food Res. Int.* 46, 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.01.001>
- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., Agboola, S., 2014a. Formation of whey protein isolate hydrolysate stabilised nanoemulsion. *Food Hydrocoll.* 41, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.007>
- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., Agboola, S., 2014b. Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. *J. Food Eng.* 122, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.034>
- Aider, M., Barbana, C., 2011. Canola proteins: Composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity - A practical and critical review. *Trends Food Sci. Technol.* 22, 21–39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.002>
- Alves, A.C., Tavares, G.M., 2019. Mixing animal and plant proteins: Is this a way to improve protein techno-functionalities? *Food Hydrocoll.* 97, 105171. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.06.016>
- Amine, C., Dreher, J., Helgason, T., Tadros, T., 2014. Investigation of emulsifying properties and emulsion stability of plant and milk proteins using interfacial tension and interfacial elasticity. *Food Hydrocoll.* 39, 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.001>
- Association of Official Analytical Chemists, 2000. *Official Methods of Analysis*.
- Avramenko, N.A., Low, N.H., Nickerson, M.T., 2013. The effects of limited enzymatic

- hydrolysis on the physicochemical and emulsifying properties of a lentil protein isolate. *Food Res. Int.* 51, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.020>
- Bengoechea, C., Romero, A., Aguilar, J.M., Cordobés, F., Guerrero, A., 2010. Temperature and pH as factors influencing droplet size distribution and linear viscoelasticity of O/W emulsions stabilised by soy and gluten proteins. *Food Hydrocoll.* 24, 783–791. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.005>
- Berry, J.D., Neeson, M.J., Dagastine, R.R., Chan, D.Y.C., Tabor, R.F., 2015. Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry. *J. Colloid Interface Sci.* 454, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.05.012>
- Berton-Carabin, C., Schroën, K., 2019. Towards new food emulsions: designing the interface and beyond. *Curr. Opin. Food Sci.* 27, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.06.006>
- Berton-Carabin, C.C., Sagis, L., Schroën, K., 2018. Formation, Structure, and Functionality of Interfacial Layers in Food Emulsions. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 9, 551–587. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012405>
- Bessada, S.M.F., Barreira, J.C.M., Oliveira, M.B.P.P., 2019. Pulses and food security: Dietary protein, digestibility, bioactive and functional properties. *Trends Food Sci. Technol.* 93, 53–68. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.022>
- Blagrove, R.J., Lilley, G.G., 1980. Characterisation of Cucurbitin from Various Species of the Cucurbitaceae. *Eur. J. Biochem.* 103, 577–584. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb05982.x>
- Bolontrade, A.J., Scilingo, A.A., Añón, M.C., 2016. Amaranth proteins foaming properties: Film rheology and foam stability - Part 2. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 141, 643–650. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.10.061>
- Bos, M.A., Van Vliet, T., 2001. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 91, 437–471. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(00\)00077-4](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(00)00077-4)
- Burger, T.G., Zhang, Y., 2019. Recent progress in the utilization of pea protein as an emulsifier for food applications. *Trends Food Sci. Technol.* 86, 25–33.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.007>

Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S., Marc, I., 2007. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochem.* 42, 1419–1428.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.07.009>

Chanamai, R., McClements, D.J., 2000. Dependence of creaming and rheology of monodisperse oil-in-water emulsions on droplet size and concentration. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 172, 79–86. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00551-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00551-3)

Chatterjee, R., Dey, T.K., Ghosh, M., Dhar, P., 2015. Enzymatic modification of sesame seed protein, sourced from waste resource for nutraceutical application. *Food Bioprod. Process.* 94, 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.01.007>

Cheng, Y., Xiong, Y.L., Chen, J., 2010. Antioxidant and emulsifying properties of potato protein hydrolysate in soybean oil-in-water emulsions. *Food Chem.* 120, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.077>

Colman, P.M., Suzuki, E., Van Donkelaar, A., 1980. The Structure of Cucurbitin: Subunit Symmetry and Organization in situ. *Eur. J. Biochem.* 103, 585–588. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb05983.x>

Đaković, L., 2006. *Koloidna hemija*, 4 izdanje. ed. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.

Damodaran, S., 2005. R: Concise Reviews / Hypotheses in Food Science Protein Stabilization of Emulsions and Foams. *Food Sci.* 70, 54–66.

Dan, A., Gochev, G., Krägel, J., Aksenenko, E. V., Fainerman, V.B., Miller, R., 2013. Interfacial rheology of mixed layers of food proteins and surfactants. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 18, 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.04.002>

Davis, J.P., Doucet, D., Foegeding, E.A., 2005. Foaming and interfacial properties of hydrolyzed β -lactoglobulin. *J. Colloid Interface Sci.* 288, 412–422. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.03.002>

Day, L., 2013. Proteins from land plants - Potential resources for human nutrition and

- food security. *Trends Food Sci. Technol.* 32, 25–42.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.05.005>
- Deng, Q., Wang, L., Wei, F., Xie, B., Huang, F.H., Huang, W., Shi, J., Huang, Q., Tian, B., Xue, S., 2011. Functional properties of protein isolates, globulin and albumin extracted from Ginkgo biloba seeds. *Food Chem.* 124, 1458–1465.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.108>
- Dickinson, E., 2011. Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures. *Food Hydrocoll.* 25, 1966–1983.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.001>
- Dickinson, E., 1999. Adsorbed protein layers at fluid interfaces: Interactions, structure and surface rheology. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 15, 161–176.
[https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(99\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(99)00042-9)
- dos Santos Aguilar, J.G., Sato, H.H., 2018. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Res. Int.* 103, 253–262.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044>
- Dukhin, S.S., Kretzschmar, G., Miller, R., 1995. Dynamics of Adsorption at Liquid Interfaces - Theory, Experiment, Application. Elsevier Sci. B. V. 1, 600.
[https://doi.org/10.1016/S1383-7303\(06\)80010-4](https://doi.org/10.1016/S1383-7303(06)80010-4)
- Eastoe, J., Dalton, J.S., 2000. Dynamic surface tension and adsorption mechanisms of surfactants at the air-water interface. *Adv. Colloid Interface Sci.* 85, 103–144.
[https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(99\)00017-2](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(99)00017-2)
- El-Adawy, T.A., Taha, K.M., 2001. Characteristics and composition of different seed oils and flours. *Food Chem.* 74, 47–54. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00337-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00337-X)
- Ercili-Cura, D., Miyamoto, A., Paananen, A., Yoshii, H., Poutanen, K., Partanen, R., 2015. Adsorption of oat proteins to air-water interface in relation to their colloidal state. *Food Hydrocoll.* 44, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.017>
- Fainerman, V.B., Makievski, A. V., Miller, R., 1994. The analysis of dynamic surface tension of sodium alkyl sulphate solutions, based on asymptotic equations of adsorption kinetic theory. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 87, 61–75.

- [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(94\)02747-1](https://doi.org/10.1016/0927-7757(94)02747-1)
- Fang, E.F., Wong, J.H., Lin, P., Ng, T.B., 2010. Biochemical characterization of the RNA-hydrolytic activity of a pumpkin 2S albumin. *FEBS Lett.* 584, 4089–4096. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.08.041>
- Fasolin, L.H., Pereira, R.N., Pinheiro, A.C., Martins, J.T., Andrade, C.C.P., Ramos, O.L., Vicente, A.A., 2019. Emergent food proteins – Towards sustainability, health and innovation. *Food Res. Int.* 125, 108586. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108586>
- Foegeding, E.A., Davis, J.P., 2011. Food protein functionality: A comprehensive approach. *Food Hydrocoll.* 25, 1853–1864. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.05.008>
- Fruhwith, G.O., Hermetter, A., 2007. Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: Components and biological activities. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109, 1128–1140. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700105>
- Gregory, J., 2013. Encyclopedia of Colloid and Interface Science, Encyclopedia of Colloid and Interface Science. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-20665-8>
- Gul, O., Saricaoglu, F.T., Besir, A., Atalar, I., Yazici, F., 2018. Effect of ultrasound treatment on the properties of nano-emulsion films obtained from hazelnut meal protein and clove essential oil. *Ultrason. Sonochem.* 41, 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.10.011>
- Hoffmann, H., Reger, M., 2014. Emulsions with unique properties from proteins as emulsifiers. *Adv. Colloid Interface Sci.* 205, 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.08.007>
- Holmberg, K., Dinesh O., S., Schwuger, M.J., 2002. Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry. John Wiley & Sons Ltd., <https://doi.org/10.1108/prt.2006.12935eac.007>
- Houde, M., Khodaei, N., Benkerroum, N., Karboune, S., 2018. Barley protein concentrates: Extraction, structural and functional properties. *Food Chem.* 254, 367–376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.156>

- Hu, Y.T., Ting, Y., Hu, J.Y., Hsieh, S.C., 2017. Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems. *J. Food Drug Anal.* 25, 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.021>
- Huang, X., Kakuda, Y., Cui, W., 2001. Hydrocolloids in emulsions: Particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocoll.* 15, 533–542. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00091-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00091-1)
- Idouraine, A., Kohlhepp, E.A., Weber, C.W., Warid, W.A., Martinez-Tellez, J.J., 1996. Nutrient constituents from eight lines of naked seed squash (*Cucurbita pepo* L.). *J. Agric. Food Chem.* 44, 721–724. <https://doi.org/10.1021/jf950630y>
- Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan, F., Yardi, V., Sharma, A., 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chem.* 121, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.027>
- Jarpa-Parra, M., Bamdad, F., Tian, Z., Zeng, H., Temelli, F., Chen, L., 2015. Impact of pH on molecular structure and surface properties of lentil legumin-like protein and its application as foam stabilizer. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 132, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.065>
- Javadi, A., Mucic, N., Karbaschi, M., Won, J.Y., Lotfi, M., Dan, A., Ulaganathan, V., Gochev, G., Makievski, A. V., Kovalchuk, V.I., Kovalchuk, N.M., Krägel, J., Miller, R., 2013. Characterization methods for liquid interfacial layers. *Eur. Phys. J. Spec. Top.* 222, 7–29. <https://doi.org/10.1140/epjst/e2013-01822-3>
- Jeske, S., Zannini, E., Arendt, E.K., 2018. Past, present and future: The strength of plant-based dairy substitutes based on gluten-free raw materials. *Food Res. Int.* 110, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.045>
- Joshi, M., Adhikari, B., Aldred, P., Panozzo, J.F., Kasapis, S., Barrow, C.J., 2012. Interfacial and emulsifying properties of lentil protein isolate. *Food Chem.* 134, 1343–1353. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.029>
- Joye, I.J., McClements, D.J., 2014. Emulsifying and emulsion-stabilizing properties of gluten hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* 62, 2623–2630.

<https://doi.org/10.1021/jf5001343>

- Karaca, A.C., Low, N., Nickerson, M., 2011a. Emulsifying properties of canola and flaxseed protein isolates produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Res. Int.* 44, 2991–2998. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.009>
- Karaca, A.C., Low, N., Nickerson, M., 2011b. Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Res. Int.* 44, 2742–2750. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.012>
- Karbaschi, M., Lotfi, M., Krägel, J., Javadi, A., Bastani, D., Miller, R., 2014. Rheology of interfacial layers. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 19, 514–519. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2014.08.003>
- Katona, J.M., Sovilj, V.J., Petrović, L.B., Mucić, N.Z., 2010. Tensiometric investigation of the interaction and phase separation in a polymer mixture-ionic surfactant ternary system. *J. Serbian Chem. Soc.* 75, 823–831. <https://doi.org/10.2298/JSC100112056K>
- Khalid, E.K., Babiker, E.E., EL Tinay, A.H., 2003. Solubility and functional properties of sesame seed proteins as influenced by pH and/or salt concentration. *Food Chem.* 82, 361–366. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00555-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00555-1)
- Kralchevsky, P.A., Nagayama, K., 2000. *Particles at Fluid Interfaces and Membranes Attachment of Colloid Particles and Proteins to Interfaces.* Interfaces (Providence). 654.
- Lacou, L., Léonil, J., Gagnaire, V., 2016. Functional properties of peptides: From single peptide solutions to a mixture of peptides in food products. *Food Hydrocoll.* 57, 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.028>
- Ladjal Ettoumi, Y., Chibane, M., Romero, A., 2016. Emulsifying properties of legume proteins at acidic conditions: Effect of protein concentration and ionic strength. *LWT - Food Sci. Technol.* 66, 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.051>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lam, R.S.H., Nickerson, M.T., 2013. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. *Food Chem.* 141, 975–984.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.038>
- Langevin, D., 2000. Influence of interfacial rheology on foam and emulsion properties. *Adv. Colloid Interface Sci.* 88, 209–222.
- Lawal, O.S., 2004. Functionality of African locust bean (*Parkia biglobossa*) protein isolate: Effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. *Food Chem.* 86, 345–355. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.036>
- Leal-Calderon, F., Bibette, J., Schmitt, V., 2007. Emulsion science: Basic principles, *Emulsion Science: Basic Principles.* <https://doi.org/10.1007/978-0-387-39683-5>
- Liang, H.N., Tang, C.H., 2013. PH-dependent emulsifying properties of pea [*Pisum sativum* (L.)] proteins. *Food Hydrocoll.* 33, 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.005>
- Lowry, A.H., Rosebrough, N.J., Fair, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Readings* 193, 265–275. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)
- Luo, Y., Pan, K., Zhong, Q., 2014. Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations. *Food Chem.* 155, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.048>
- Maldonado-Valderrama, J., Fainerman, V.B., Aksenenko, E., Gálvez-Ruiz, M.J., Cabrerizo-Vílchez, M.A., Miller, R., 2005. Dynamics of protein adsorption at the oil-water interface: Comparison with a theoretical model. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 261, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.10.131>
- Malik, M.A., Saini, C.S., 2018. Improvement of functional properties of sunflower protein isolates near isoelectric point: Application of heat treatment. *Lwt* 98, 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.009>
- Marcone, M.F., 1999. Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: A current understanding with emphasis on 11S seed globulins. *Food Res. Int.* 32, 79–92. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00061-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00061-7)
- Marcone, M.F., Kakuda, Y., Yada, R.Y., 1998. Salt soluble seed globulins of dicotyledonous and monocotyledonous plants II. Structural characterization. *Food*

- Chem. 63, 265–274. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00159-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00159-3)
- Martínez, K.D., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M., Pilosof, A.M.R., 2009. Interfacial and foaming properties of soy protein and their hydrolysates. *Food Hydrocoll.* 23, 2149–2157. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.03.015>
- Martínez, K.D., Sánchez, C.C., Ruíz-Henestrosa, V.P., Rodríguez Patino, J.M., Pilosof, A.M.R., 2007. Effect of limited hydrolysis of soy protein on the interactions with polysaccharides at the air-water interface. *Food Hydrocoll.* 21, 813–822. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.09.008>
- Maurer, R.W., Sandler, S.I., Lenhoff, A.M., 2011. Salting-in characteristics of globular proteins. *Biophys. Chem.* 156, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2011.02.002>
- McClements, D.J., 2004a. *Food emulsions: principles, practice, and techniques*, 2nd editio. ed. CRC PRESS.
- McClements, D.J., 2004b. Protein-stabilized emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 9, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.09.003>
- McClements, D.J., Gumus, C.E., 2016. Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Adv. Colloid Interface Sci.* 234, 3–26. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.03.002>
- McClements, D.J., Jafari, S.M., 2018. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 251, 55–79. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.12.001>
- Mendoza, A.J., Guzmán, E., Martínez-Pedrero, F., Ritacco, H., Rubio, R.G., Ortega, F., Starov, V.M., Miller, R., 2014. Particle laden fluid interfaces: Dynamics and interfacial rheology. *Adv. Colloid Interface Sci.* 206, 303–319. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.10.010>
- Milanović, J., Petrović, L., Sovilj, V., Katona, J., 2014. Complex coacervation in gelatin/sodium caseinate mixtures. *Food Hydrocoll.* 37, 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.016>
- Milinković, J., Petrović, L., Fraj, J., Bučko, S., Katona, J., Spasojević, L., 2018.

- Interfacial and emulsifying properties of chitosan/sodium lauryl ether sulfate system. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.06.085>
- Miller, R., Aksenenko, E. V., Fainerman, V.B., 2017. Dynamic interfacial tension of surfactant solutions. *Adv. Colloid Interface Sci.* 247, 115–129. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.12.007>
- Miller, R., Ferri, J.K., Javadi, A., Krägel, J., Mucic, N., Wüstneck, R., 2010. Rheology of interfacial layers. *Colloid Polym. Sci.* 288, 937–950. <https://doi.org/10.1007/s00396-010-2227-5>
- Miñones Conde, J., Rodríguez Patino, J.M., 2007. Phospholipids and hydrolysates from a sunflower protein isolate adsorbed films at the air-water interface. *Food Hydrocoll.* 21, 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.03.010>
- Mokni Ghribi, A., Maklouf Gafsi, I., Sila, A., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., Bougatef, A., Besbes, S., 2015. Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. *Food Chem.* 187, 322–330. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.109>
- Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2006. Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Res. Int.* 39, 945–963. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.07.002>
- Mucic, N., Javadi, A., Kovalchuk, N.M., Aksenenko, E. V., Miller, R., 2011. Dynamics of interfacial layers-Experimental feasibilities of adsorption kinetics and dilational rheology. *Adv. Colloid Interface Sci.* 168, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.06.001>
- Murray, B.S., 2002. Interfacial rheology of food emulsifiers and proteins. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 7, 426–431. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(02\)00077-8](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00077-8)
- Nazari, B., Mohammadifar, M.A., Shojaee-Aliabadi, S., Feizollahi, E., Mirmoghtadaie, L., 2018. Effect of ultrasound treatments on functional properties and structure of millet protein concentrate. *Ultrason. Sonochem.* 41, 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.10.002>

- Neto, V.Q., Narain, N., Silva, J.B., Bora, P.S., 2001. Functional properties of raw and heat processed cashew nut (*Anacardium occidentale*, L.) kernel protein isolates. *Nahrung - Food* 45, 258–262. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20010801\)45:4<258::AID-FOOD258>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20010801)45:4<258::AID-FOOD258>3.0.CO;2-3)
- Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S., Phillips, G.O., 2014. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocoll.* 39, 301–318. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.013>
- Nnanna, I.A., Xia, J., 2001. Protein-based surfactants, Surfactant science series, volume 101. Marcel Dekker, Inc.
- Osman, S.F., Irwin, P., Fett, W.F., O'Connor, J. V., Parris, N., 1999. Preparation, isolation, and characterization of cutin monomers and oligomers from tomato peels. *J. Agric. Food Chem.* 47, 799–802. <https://doi.org/10.1021/jf980693r>
- Ozturk, B., McClements, D.J., 2016. Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Curr. Opin. Food Sci.* 7, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.008>
- Panyam, D., Kilara, A., 1996. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification Dinakar Panyam and Arun Kilara I. *Trends food Sci. Technol.* 7, 120–125.
- Papalamprou, E.M., Doxastakis, G.I., Kiosseoglou, V., 2010. Chickpea protein isolates obtained by wet extraction as emulsifying agents. *J. Sci. Food Agric.* 90, 304–313. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3816>
- Patino, J.M.R., Niño, M.R.R., Sánchez, C.C., Ortiz, S.E.M., Añón, M.C., 2005. Dilatational properties of soy globulin adsorbed films at the air-water interface from acidic solutions. *J. Food Eng.* 68, 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.06.020>
- Pérez, S.G.-, Vereijken, J.M., Koningsveld, G.A., Gruppen, H., Voragen, A.G.J., 2005. Physicochemical Properties of 2S Albumins and the Corresponding Protein Isolate from Sunflower (*Helianthus annuus*). *J. Food Sci.* 70, C98–C103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09029.x>
- Peričin, D., Radulović-Popović, L., Vaštag, Ž., Madarev-Popović, S., Trivić, S., 2009.

- Enzymatic hydrolysis of protein isolate from hull-less pumpkin oil cake: Application of response surface methodology. *Food Chem.* 115, 753–757. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.040>
- Peričin, D., Radulović, L., Trivić, S., Dimić, E., 2008. Evaluation of solubility of pumpkin seed globulins by response surface method. *J. Food Eng.* 84, 591–594. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.07.002>
- Petrović, L.B., 2016. Tehnologija kozmetičkih proizvoda, praktikum. Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Petrović, L.B., Sovilj, V.J., Katona, J.M., Milanovic, J.L., 2010. Influence of polymer-surfactant interactions on o/w emulsion properties and microcapsule formation. *J. Colloid Interface Sci.* 342, 333–339. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.10.077>
- Pichl, I., 1976. Seed globulins of various species of cucurbitaceae. *Phytochemistry* 15, 717–722. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94428-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94428-5)
- Pojić, M., Mišan, A., Tiwari, B., 2018. Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends Food Sci. Technol.* 75, 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.010>
- Popović, L., Peričin, D., Vaštag, Ž., Popović, S., Krimer, V., Torbica, A., 2013. Antioxidative and functional properties of pumpkin oil cake globulin hydrolysates. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* 90, 1157–1165. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2257-5>
- Potter, N., Hotchkiss, J., 1995. *Food Science*, 5th ed. Chapman & Hall, New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4985-7>
- Quanhong, L., Caili, F., 2005. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food Chem.* 92, 701–706. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.042>
- Rabrenović, B.B., Dimić, E.B., Novaković, M.M., Tešević, V. V., Basić, Z.N., 2014. The most important bioactive components of cold pressed oil from different pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds. *LWT - Food Sci. Technol.* 55, 521–527. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.019>

- Radha, C., Ramesh Kumar, P., Prakash, V., 2008. Preparation and characterization of a protein hydrolysate from an oilseed flour mixture. *Food Chem.* 106, 1166–1174. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.063>
- Rangsansarid, J., Fukada, K., 2007. Factors affecting the stability of O/W emulsion in BSA solution: Stabilization by electrically neutral protein at high ionic strength. *J. Colloid Interface Sci.* 316, 779–786. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.07.040>
- Ravera, F., Loglio, G., Kovalchuk, V.I., 2010. Interfacial dilational rheology by oscillating bubble/drop methods. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 15, 217–228. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2010.04.001>
- Rezig, L., Chibani, F., Chouaibi, M., Dalgarrondo, M., Hessini, K., Guéguen, J., Hamdi, S., 2013. Pumpkin (*cucurbita maxima*) seed proteins: Sequential extraction processing and fraction characterization. *J. Agric. Food Chem.* 61, 7715–7721. <https://doi.org/10.1021/jf402323u>
- Robins, M.M., 2000. Emulsions - creaming phenomena* 5, 265–272.
- Rodrigues, I.M., Coelho, J.F.J., Carvalho, M.G.V.S., 2012. Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. *J. Food Eng.* 109, 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.027>
- Rodríguez Niño, M.R., Sánchez, C.C., Ruíz-Henestrosa, V.P., Patino, J.M.R., 2005. Milk and soy protein films at the air-water interface. *Food Hydrocoll.* 19, 417–428. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.10.008>
- Rodríguez Patino, J.M., Miñones Conde, J., Linares, H.M., Pedroche Jiménez, J.J., Carrera Sánchez, C., Pizones, V., Rodríguez, F.M., 2007. Interfacial and foaming properties of enzyme-induced hydrolysis of sunflower protein isolate. *Food Hydrocoll.* 21, 782–793. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.09.002>
- Rodriguez Patino, J.M., Pilosof, A.M.R., 2011. Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocoll.* 25, 1925–1937. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.023>
- Romero, A., Beaumal, V., David-Briand, E., Cordobes, F., Guerrero, A., Anton, M., 2012. Interfacial and emulsifying behaviour of rice protein concentrate. *Food*

- Hydrocoll. 29, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.01.013>
- Rudakova, A.S., Rudakov, S. V., Kakhovskaya, I.A., Shutov, A.D., 2014. 11S storage globulin from pumpkin seeds: Regularities of proteolysis by papain. *Biochem.* 79, 820–825. <https://doi.org/10.1134/S0006297914080100>
- Ruíz-Henestrosa, V.P., Sánchez, C.C., Del Mar Yust, M., Pedroche, J., Millán, F., Patino, J.M.R., 2007a. Limited enzymatic hydrolysis can improve the interfacial and foaming characteristics of β -conglycinin. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1536–1545. <https://doi.org/10.1021/jf0628476>
- Ruíz-Henestrosa, V.P., Sánchez, C.C., Escobar, M. del M.Y., Jiménez, J.J.P., Rodríguez, F.M., Patino, J.M.R., 2007b. Interfacial and foaming characteristics of soy globulins as a function of pH and ionic strength. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 309, 202–215. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.01.030>
- Ruíz-Henestrosa, V.P., Sánchez, C.C., Pedroche, J.J., Millán, F., Rodríguez Patino, J.M., 2009. Improving the functional properties of soy glycinin by enzymatic treatment. Adsorption and foaming characteristics. *Food Hydrocoll.* 23, 377–386. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.03.011>
- Sagis, L.M.C., Scholten, E., 2014. Complex interfaces in food: Structure and mechanical properties. *Trends Food Sci. Technol.* 37, 59–71. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.009>
- Sara, A.S., Mathé, C., Basselin, M., Fournier, F., Aymes, A., Bianeis, M., Galet, O., Kapel, R., 2020. Optimization of sunflower albumin extraction from oleaginous meal and characterization of their structure and properties. *Food Hydrocoll.* 99, 105335. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105335>
- Schröder, A., Berton-Carabin, C., Venema, P., Cornacchia, L., 2017. Interfacial properties of whey protein and whey protein hydrolysates and their influence on O/W emulsion stability. *Food Hydrocoll.* 73, 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.001>
- Schwenke, K.D., 2001. Reflections about the functional potential of legume proteins: A review. *Nahrung - Food* 45, 377–381. <https://doi.org/10.1002/1521->

3803(20011001)45:6<377::AID-FOOD377>3.0.CO;2-G

- Seta, L., Baldino, N., Gabriele, D., Lupi, F.R., Cindio, B. de, 2014. Rheology and adsorption behaviour of β -casein and β -lactoglobulin mixed layers at the sunflower oil/water interface. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 441, 669–677. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.10.041>
- Shao, Y., Tang, C.H., 2014. Characteristics and oxidative stability of soy protein-stabilized oil-in-water emulsions: Influence of ionic strength and heat pretreatment. *Food Hydrocoll.* 37, 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.030>
- Singh, M., Adedeji, A., Santra, D., 2018. Physico-chemical and functional properties of nine proso millet cultivars, *Transactions of the ASABE*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.13031/trans.12553>
- Sinha, R., Radha, C., Prakash, J., Kaul, P., 2007. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chem.* 101, 1484–1491. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.021>
- Soleimani, H., Baig, M.K., Yahya, N., Khodapanah, L., Sabet, M., Demiral, B.M.R., Burda, M., 2018. Synthesis of ZnO nanoparticles for oil–water interfacial tension reduction in enhanced oil recovery. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 124, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00339-017-1510-4>
- Sovilj, V., Milanović, J., Petrović, L., 2013. Viscosimetric and tensiometric investigations of interactions between gelatin and surface active molecules of various structures. *Food Hydrocoll.* 32, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.12.003>
- Sun, X.D., 2011. Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46, 2447–2459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02785.x>
- Sze-Tao, K.W.C., Sathe, S.K., 2000. Functional properties and in vitro digestibility of almond (*Prunus dulcis* L.) protein isolate. *Food Chem.* 69, 153–160. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00244-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00244-7)
- Taha, A., Ahmed, E., Hu, T., Xu, X., Pan, S., Hu, H., 2019. Effects of different ionic

- strengths on the physicochemical properties of plant and animal proteins-stabilized emulsions fabricated using ultrasound emulsification. *Ultrason. Sonochem.* 58. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104627>
- Tamm, F., Drusch, S., 2017. Impact of enzymatic hydrolysis on the interfacial rheology of whey protein/pectin interfacial layers at the oil/water-interface. *Food Hydrocoll.* 63, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.013>
- Tamm, F., Herbst, S., Brodkorb, A., Drusch, S., 2016. Functional properties of pea protein hydrolysates in emulsions and spray-dried microcapsules. *Food Hydrocoll.* 58, 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.032>
- Tan, S.H., Mailer, R.J., Blanchard, C.L., Agboola, S.O., 2014. Emulsifying properties of proteins extracted from Australian canola meal. *LWT - Food Sci. Technol.* 57, 376–382. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.040>
- Tang, C.H., Shen, L., 2015. Dynamic adsorption and dilatational properties of BSA at oil/water interface: Role of conformational flexibility. *Food Hydrocoll.* 43, 388–399. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.06.014>
- Tavano, O.L., 2013. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 90, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>
- Thaiphanit, S., Schleining, G., Anprung, P., 2016. Effects of coconut (*Cocos nucifera* L.) protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis on the stability and rheological properties of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocoll.* 60, 252–264. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.035>
- Tomar, P.P.S., Nikhil, K., Singh, A., Selvakumar, P., Roy, P., Sharma, A.K., 2014. Characterization of anticancer, DNase and antifungal activity of pumpkin 2S albumin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 448, 349–354. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.158>
- Tsaliki, E., Pegiadou, S., Doxastakis, G., 2004. Evaluation of the emulsifying properties of cottonseed protein isolates. *Food Hydrocoll.* 18, 631–637. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.11.001>

- Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., Kugimiya, W., Inouye, K., 2005. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *LWT - Food Sci. Technol.* 38, 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.06.007>
- Turan, D., Altay, F., Çapanoğlu Güven, E., 2015a. The influence of thermal processing on emulsion properties of defatted hazelnut flour. *Food Chem.* 167, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.070>
- Turan, D., Capanoglu, E., Altay, F., 2015b. Investigating the effect of roasting on functional properties of defatted hazelnut flour by response surface methodology (RSM). *LWT - Food Sci. Technol.* 63, 758–765. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.061>
- Ushikubo, F.Y., Cunha, R.L., 2014. Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions. *Food Hydrocoll.* 34, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.016>
- Van Aken, G.A., Blijdenstein, T.B.J., Hotrum, N.E., 2003. Colloidal destabilisation mechanisms in protein-stabilized emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 8, 371–379. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(03\)00098-0](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(03)00098-0)
- Van der Ven, C., Gruppen, H., De Bont, D.B.A., Voragen, A.G.J., 2001. Emulsion properties of casein and whey protein hydrolysates and the relation with other hydrolysate characteristics. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5005–5012. <https://doi.org/10.1021/jf010144c>
- van Kempen, S.E.H.J., Maas, K., Schols, H.A., van der Linden, E., Sagis, L.M.C., 2013. Interfacial properties of air/water interfaces stabilized by oligofructose palmitic acid esters in the presence of whey protein isolate. *Food Hydrocoll.* 32, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.12.024>
- Van Vliet, T., Martin, A.H., Bos, M.A., 2002. Gelation and interfacial behaviour of vegetable proteins. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 7, 462–468. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(02\)00078-X](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00078-X)
- Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V., Peričin, D., 2011. Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme

- inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chem.* 124, 1316–1321. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.062>
- 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 Bioprod. Process.* 88, 277–282. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.12.003>
- Ventureira, J., Martínez, E.N., Añón, M.C., 2010. Stability of oil: Water emulsions of amaranth proteins. Effect of hydrolysis and pH. *Food Hydrocoll.* 24, 551–559. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.12.008>
- Ventureira, J.L., Bolontrade, A.J., Speroni, F., David-Briand, E., Scilingo, A.A., Ropers, M.H., Boury, F., Añón, M.C., Anton, M., 2012. Interfacial and emulsifying properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates under different conditions of pH. *LWT - Food Sci. Technol.* 45, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.07.024>
- Venuste, M., Zhang, X., Shoemaker, C.F., Karangwa, E., Abbas, S., Kamdem, P.E., 2013. Influence of enzymatic hydrolysis and enzyme type on the nutritional and antioxidant properties of pumpkin meal hydrolysates. *Food Funct.* 4, 811–820. <https://doi.org/10.1039/c3fo30347k>
- Wang, J.S., Wang, A.B., Zang, X.P., Tan, L., Xu, B.Y., Chen, H.H., Jin, Z.Q., Ma, W.H., 2019. Physicochemical, functional and emulsion properties of edible protein from avocado (*Persea americana* Mill.) oil processing by-products. *Food Chem.* 288, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.098>
- Wani, I.A., Sogi, D.S., Gill, B.S., 2015. Physico-chemical and functional properties of native and hydrolysed protein isolates from Indian black gram (*Phaseolus mungo*L.) cultivars. *LWT - Food Sci. Technol.* 60, 848–854. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.060>
- Ward, A.F.H., Tordai, L., 1946. Time-Dependence of Boundary Tensions of Solutions I. The Role of Diffusion in Time-Effects. *J. Chem. Phys.* 14, 453–461.
- Wilde, P.J., 2000. Interfaces: Their role in foam and emulsion behaviour. *Curr. Opin.*

- Colloid Interface Sci. 5, 176–181. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(00\)00056-X](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(00)00056-X)
- Wu, D., Tu, M., Wang, Z., Wu, C., Yu, C., Battino, M., El-Seedi, H.R., Du, M., 2019. Biological and conventional food processing modifications on food proteins: Structure, functionality, and bioactivity. *Biotechnol. Adv.* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107491>
- Wu, H., Wang, Q., Ma, T., Ren, J., 2009. Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein. *Food Res. Int.* 42, 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.006>
- Wu, J., Muir, A.D., 2008. Comparative structural, emulsifying, and biological properties of 2 major canola proteins, cruciferin and napin. *J. Food Sci.* 73. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00675.x>
- Yadav, M., Jain, S., Tomar, R., Prasad, G.B.K.S., Yadav, H., 2010. Medicinal and biological potential of pumpkin: An updated review. *Nutr. Res. Rev.* 23, 184–190. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000107>
- Yalçın, E., Çelik, S., 2007. Solubility properties of barley flour, protein isolates and hydrolysates. *Food Chem.* 104, 1641–1647. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.029>
- Yampolskaya, G., Platikanov, D., 2006. Proteins at fluid interfaces: Adsorption layers and thin liquid films. *Adv. Colloid Interface Sci.* 128–130, 159–183. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.11.018>
- Yuan, B., Ren, J., Zhao, M., Luo, D., Gu, L., 2012. Effects of limited enzymatic hydrolysis with pepsin and high-pressure homogenization on the functional properties of soybean protein isolate. *LWT - Food Sci. Technol.* 46, 453–459. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.001>
- Yuliana, M., Truong, C.T., Huynh, L.H., Ho, Q.P., Ju, Y.H., 2014. Isolation and characterization of protein isolated from defatted cashew nut shell: Influence of pH and NaCl on solubility and functional properties. *LWT - Food Sci. Technol.* 55, 621–626. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.022>
- Yust, M. del M., Pedroche, J., Millán-Linares, M. del C., Alcaide-Hidalgo, J.M., Millán,

- F., 2010. Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. *Food Chem.* 122, 1212–1217. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.121>
- Zhai, J. li, Day, L., Aguilar, M.I., Wooster, T.J., 2013. Protein folding at emulsion oil/water interfaces. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 18, 257–271. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.03.002>
- Zhao, G., Liu, Y., Zhao, M., Ren, J., Yang, B., 2011. Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate. *Food Chem.* 127, 1438–1443. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.046>
- Živanović, I., Vaštag, Ž., Popović, S., Popović, L., Peričin, D., 2011. Hydrolysis of hull-less pumpkin oil cake protein isolate by pepsin. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 75, 67–71.

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Адсорпциона и емулгујућа својства протеинског изолата и хидролизата семена тикве (<i>Cucurbita pepo</i>)
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет Нови Сад, Србија б) Макс Планк институт за колоиде и границе фаза (енг. <i>Max Planck Institute of Colloids and Interfaces</i>), Потсдам, Немачка
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
1. Пројекат Републичког програма интегралних и интердисциплинарних истраживања, број 46010, под називом „Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности“ 2. ЦОСТ акција број МП1106
1. Опис података
<i>1.1 Врста студије</i> <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> <u>Докторска дисертација</u>

1.2 Врсте података

- Ⓐ квантитативни
- Ⓑ квалитативни

1.3. Начин прикупљања података

- а) анкете, упитници, тестови
- б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи
- в) генотипови: навести врсту _____
- г) административни подаци: навести врсту _____
- Ⓓ узорци ткива: навести врсту протеинске фракције семена тикве (*Cucurbita pepo*)
- Ⓔ снимци, фотографије: навести врсту микрофотографије емулзија и фотографије узорака током експерименталног рада
- Ⓕ текст, навести врсту литература
- ж) мапа, навести врсту _____
- Ⓖ остало: описати експериментални резултати

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

Експериментални подаци

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- Ⓐ Ехсел фајл, датотека .xlsx
- б) SPSS фајл, датотека _____
- Ⓒ PDF фајл, датотека .pdf
- Ⓓ Текст фајл, датотека .docx
- Ⓔ JPG фајл, датотека .jpg, .jpeg, .tif
- ф) Остало, датотека _____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- а) број варијабли 14 (3 протеинске фракције, 6 рН вредности и 5 различитих вредности јонске јачине)
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) _____

1.3.3. Поновљена мерења

- а) да
- б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је од неколико минута до неколико дана
- б) варијабле које се више пута мере односе се на све експерименталне анализе
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као:

Напомене:

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

- а) Да
- б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип анализа функционалних особина протеина са нагласком на адсорпционим и емулгујућим својствима

б) корелационо истраживање, навести тип _____

ц) анализа текста, навести тип прикупљање литературних података и упоређивање са експерименталним резултатима

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? _____

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података _____

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан одређивањем поновљивости добијених резултата

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података је извршена упоређивањем са експерименталним резултатима и литературним подацима

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у HaPдУс– Националном репозиторијуму дисертација у Србији и у репозиторијуму Информационог система научне делатности Универзитета у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса

http://nardus.mpn.gov.rs/?locale-attribute=sr_RS

<https://www.cris.uns.ac.rs/searchDissertations.jsf>

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- а) Да
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____
- в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум. _____

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? _____

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена? Да Не

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодексa о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање _____

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

- а) јавно доступни
- б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области
- ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе _____

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима: _____

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Сандра Бучко, sandranj@uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Сандра Бучко, sandranj@uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Сандра Бучко, sandranj@uns.ac.rs