



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD



**PROTEINI LEBLEBIJE (*Cicer arietinum* L.) – ENZIMSKA
EKSTRAKCIJA, KARAKTERIZACIJA I MODIFIKACIJA U
NANOSTRUKTURE POGODNE ZA UNAPREĐENU PRIMENU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
prof. dr Mirjana Antov

Kandidat:
mast. inž. tehnol. Milica Perović

Novi Sad, 2023.



UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY NOVI SAD



**CHICKPEA PROTEINS (*Cicer arietinum* L.) - ENZYMATIC
EXTRACTION, CHARACTERIZATION AND MODIFICATION
INTO NANOSTRUCTURES SUITABLE FOR ADVANCED
APPLICATION**

PhD THESIS

Supervisor:
Prof. Dr. Mirjana Antov

Candidate:
MSc Milica Perović

Novi Sad, 2023

Zahvalnica

Neizmernu zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. dr Mirjani Antov, na posvećenosti, nesebičnim profesionalnim savetima i uloženom trudu u svakom koraku izrade ove doktorske disertacije, od ideje do finalne forme. Najiskrenije se zahvaljujem na divnoj saradnji, njenom strpljenju, razumevanju, rečima podrške i poverenju koje mi je ukazala.

Beskrajno joj hvala!

Veliko hvala koleginicama Maji i Tanji na prijateljskoj saradnji koja je na najlepší način unapredila kvalitet ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem i svom malom krugu velikih ljudi, Milani, Sonji, Lidiji, Dunji, Vanji, Džou, Miloradu, Ognjenu i Stefanu koji su uvek bili uz mene i iskrenim rečima podrške učinili da spoznam najlepše strane prijateljstva.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj divnoj porodici, roditeljima Neđu i Dragici, i sestrama Jeleni i Bojani koji su bili moja najveća podrška i koji su svaki moj životni korak učinili lakšim i lepšim. Hvala im na nemerljivoj ljubavi koja me motivisala da ostvarim ovaj uspeh i budem osoba kakva sam danas.

Svoju doktorsku disertaciju posvećujem upravo njima.

Milica

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA¹

Vrsta rada:	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora:	Milica Perović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	dr Mirjana Antov, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu
Naslov rada:	Proteini leblebije (<i>Cicer arietinum</i> L.) – enzimska ekstrakcija, karakterizacija i modifikacija u nanostrukture pogodne za unapređenu primenu
Jezik publikacije (pismo):	Srpski (latinica)
Fizički opis rada:	Stranica: 117 Poglavlja: 7 Referenci: 277 Tabela: 24 Slika: 35 Grafikona: 0 Priloga: 3
Naučna oblast:	Tehnološko inženjerstvo
Uža naučna oblast (naučna disciplina):	Biotehnologija
Ključne reči / predmetna odrednica:	Leblebija, enzimi, proteinski izolati, frakcije proteina, funkcionalne osobine, proteinske nanočestice
Rezime na jeziku rada:	U prvoj fazi istraživanja ove doktorske disertacije ispitan je efekt upotrebe različitih enzima za depolimerizaciju komponenata ćelijskog zida biljaka i njegovu razgradnju sa ciljem povećanja ekstrakcionog prinosa proteina iz semena leblebije (<i>Cicer arietinum</i> L.) dobijenog u konvencionalnom alkalnom postupku. Pored toga, sagledan je i efekt enzimskih pretretmana sirovine na funkcionalne i antioksidativne osobine dobijenih izolata koje predstavljaju glavni potencijal njihovog

¹ Autor doktorske disertacije potpisao je i priložio sledeće Obrasce:

56 – Izjava o autorstvu;

5B – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije i o ličnim podacima;

5r – Izjava o korišćenju.

Ove Izjave se čuvaju na fakultetu u štampanom i elektronskom obliku i ne koriče se sa tezom.

korišćenja. U drugoj fazi istraživanja sekvencijalnom ekstrakcijom semena leblebije izolovane su albuminska, globulinska i glutelinska frakcija, koje su takođe okarakterisane u pogledu funkcionalnih osobina i antioksidativne aktivnosti. Treća faza istraživanja bila je bazirana na ispitivanju mogućnosti pripreme proteinskih nanostrukture iz proteinskih izolata i frakcija proteina leblebije. U tom smislu su ispitani uslovi pod kojima se formiraju proteinske nanostrukture sa najboljim osobinama u pogledu karakteristika i svojstava nanonosaa, kao i njihovih interakcija sa različitim bioaktivnim jedinjenjima.

Rezultati su pokazali da je alkalnim postupkom ekstrahovano približno dve trećine ukupnih proteina iz semena leblebije. Primena individualne arabinofuranozidaze ili kombinacije celulaza i ksilanaze u tretmanima koje su prethodili alkalnoj ekstrakciji dovela je do gotovo potpune ekstrakcije proteina iz obezmašćenog semena leblebije, uz poboljšanje efikasnosti ovog postupka za više od 25% u poređenju sa alkalnom ekstrakcijom. Kada su analizirane funkcionalne osobine, proteinski izolati iz ekstrakcija potpomognutih kombinacijom celulaza i ksilanaze, kao i arabinofuranozidazom pokazali su veću rastvorljivost (93% i 86%, redom) u odnosu na alkalni izolat (83%). Takođe, za ove izolate su dobijene veće vrednosti kapaciteta zadržavanja vode i ulja, poboljšane emulgujuće karakteristike i svojstva penjenja. Pored poboljšanja funkcionalnih osobina, pretretman arabinofuranozidazom, i kombinacijom celulaza i ksilanaze poboljšao je *in vitro* antioksidativnu aktivnost alkalnog izolata za 70%, odnosno za više od 100%.

Kada se porede rezultati dobijeni za frakcije proteina leblebije, frakcija globulina je imala najveću (oko 85%) a frakcija glutelina najmanju (oko 65%) rastvorljivost pod ispitivanim uslovima. Kapaciteti zadržavanja vode i ulja glutelinske frakcije bili su značajno veći od kapaciteta koje su imale druge dve frakcije. Emulgujuća aktivnost glutelina bila je značajno veća od aktivnosti albumina i globulina, dok su značajno veći rezultati za stabilnost emulzija dobijeni za globulinsku i albuminsku frakciju. Rezultati za kapacitet i stabilnost pene su pokazali da su svojstva penjenja glutelina bila većih vrednosti u poređenju sa onim albumina i globulina. Kada je reč o biološkoj aktivnosti, frakcije albumina i glutelina su pokazale sličnu *in vitro* antioksidativnu aktivnost, dok je frakcija globulina imala značajno nižu vrednost.

Kao rezultat različitog vremena trajanja termičkog tretmana i vrednosti pH na kom su pripremane, dobijene su proteinske (nano)čestice različitih veličina, i to u rasponu od 28 nm do 290 nm za one iz proteinskih izolata, i od 23 nm do 405 nm za (nano)strukture iz frakcija proteina leblebije. Nanočestice pripremljene iz proteinskih izolata dobijenih iz enzimski potpomognutih alkalnih ekstrakcija imale su manje

	<p>prečnike i veću stabilnost tokom skladištenja, pri većoj pH, u poređenju sa nanočesticama pripremljenim iz alkalnog proteinskog izolata. Pored toga, nanočestice pripremljene od proteinskog izolata iz ekstrakcije potpomognute kombinacijom celulaza i ksilanaze pokazale su najveću <i>in vitro</i> antioksidativnu aktivnost, dok su one pripremljene od proteinskog izolata iz ekstrakcije potpomognute arabinofuranozidazom pokazale superiorniji kapacitet vezivanja linolne kiseline. Ako se porede rezultati dobijeni za nanočestice iz frakcija proteina, najmanje nanočestice, koje su takođe pokazale i najveću stabilnost tokom skladištenja, su dobijene iz glutelinske frakcije pri višoj pH. Nanočestice pripremljene od albuminske frakcije pokazale su veći kapacitet vezivanja linolne kiseline u odnosu na nanočestice iz druge dve frakcije, dok su one dobijene iz glutelinske i albuminske frakcije ispoljile najveću <i>in vitro</i> antioksidativnu aktivnost.</p>
Datum prihvatanja teme od strane nadležnog veća:	25.02.2021.
Datum odbrane: (Popunjava odgovarajuća služba)	
Članovi komisije: (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	<p>Predsednik: dr Marina Šćiban, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu; Član/mentor: dr Mirjana Antov, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu; Član: dr Biljana Pajin, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu; Član: dr Zorica Knežević Jugović, redovni profesor, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu; Član: dr Dejan Bezbradica, redovni profesor, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu.</p>
Napomena:	

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Milica Perović
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Dr. Mirjana Antov, Full professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad
Thesis title:	Chickpea proteins (<i>Cicer arietinum</i> L.) - enzymatic extraction, characterization and modification into nanostructures suitable for advanced application
Language of text (script):	Serbian language (latin skript)
Physical description:	Pages 117 Chapters: 7 References: 277 Tables: 24 Illustrations: 35 Graphs: 0 Appendices: 3
Scientific field:	Technology engineering
Scientific subfield (scientific discipline):	Biotechnology
Subject, Key words:	Chickpea, enzymes, protein isolates, protein fractions, functional properties, protein nanoparticles
Abstract in English language:	In the initial phase of this doctoral dissertation the possibility to increase yield of alkali extracted protein from chickpea (<i>Cicer arietinum</i> L.) seed by pretreatment with different enzymes, that can depolymerize components the of the cell wall and degrade it, was examined. The effect of enzymatic pretreatment of material on functional and antioxidant properties of obtained protein isolates as important determinants of their application was also analyzed. In the second phase, albumin, globulin and glutelin fractions were

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at he faculty and are not included into the printed thesis.

subsequently extracted from chickpea seed and characterized in terms of their functional and antioxidant properties. The possibility of preparing protein nanostructures from chickpea protein isolates and fractions was explored in the third phase. Various processing conditions that led to the formation of protein nanostructures with beneficial characteristics were examined in terms of nanocarriers' properties as well as their interactions with some bioactive compounds.

Results showed that in alkaline process approximately two-thirds of the total protein was extracted from defatted chickpea seed. The application of individual arabinofuranosidase, and combination of cellulase and xylanase prior to alkaline extraction led to almost complete protein extraction from defatted chickpea; this represented improvement in extraction efficiency for more than 25% compared to alkaline extraction. When functional properties were analyzed, protein isolates from extractions assisted with combination of cellulases and xylanase as well as with individual arabinofuranosidase had higher solubility (93% and 86%, respectively), compared to alkaline isolate (83%). Furthermore, higher values of water and oil holding capacities, enhanced emulsifying and foaming properties were obtained for these isolates. In addition to improving functional properties, pretreatments with arabinofuranosidase, and combination of cellulase and xylanase increased antioxidant activity of alkaline isolate by 70% and more than 100%, respectively.

When comparing results obtained for the protein fractions, it was evident that globulin fraction had the highest solubility at the applied conditions (about 85%), while the lowest solubility (about 65%) was obtained for glutelin fraction. Water and oil holding capacities of the glutelin fraction were significantly higher compared to the capacities of the other two. The emulsifying activity of glutelin was significantly higher than that of albumin and globulin, while significantly higher results for emulsion stability were obtained for globulin and albumin fractions. The results of foam capacity and stability showed that the foaming properties of glutelin were higher compared to the properties of albumin and globulin fractions. Regarding biological activity, albumin and glutelin fractions expressed similar *in vitro* antioxidant activity while globulin fraction showed significantly lower result.

As a result of varying duration and pH value of applied thermal treatment, protein (nano)particles of different sizes were obtained ranging from 28 nm to 290 nm for those prepared from protein isolates, and from 23 nm to 405 nm for (nano)structures prepared from protein fractions. Nanoparticles prepared from alkaline protein isolates extracted with the assistance of enzymes showed lower particle sizes and higher storage stability at higher investigated pH compared to nanoparticles prepared from protein isolate from alkaine

	<p>extraction only. Additionally, nanoparticles from protein isolate obtained from extraction assisted with combination of cellulase and xylanase showed the highest <i>in vitro</i> antioxidant activity while nanoparticles prepared from isolate from extraction assisted with arabinofuranosidase showed superior binding capacity of linoleic acid. As for the nanoparticles from protein fractions, the smallest nanoparticles with highest storage stability were produced from glutelin fraction, at higher investigated pH. Nanoparticles prepared from albumin fraction showed higher linoleic acid binding capacity compared to nanoparticles prepared from other two fractions, while nanoparticles obtained from the glutelin and albumin fractions had the highest <i>in vitro</i> antioxidant activity.</p>
Accepted on Scientific Board on:	25.02.2021.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>President: Dr. Marina Šćiban, Full Professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad; Member/Supervisor: Dr. Mirjana Antov, Full Professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad; Member: Dr. Biljana Pajin, Full Professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad; Member: Dr. Zorica Knežević Jugović, Full Professor, Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade; Member: Dr. Dejan Bezbradica, Full Professor, Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade.</p>
Note:	

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Teorijski deo.....	3
2.1. Biljni proteini.....	3
2.2. Leblebija kao izvor proteina.....	5
2.2.1. Nutritivni sastav semena leblebije.....	6
2.3. Protein leblebije.....	6
2.3.1. Frakcije proteina leblebije.....	7
2.3.2. Elementi sekundarne strukture proteina mahunarki.....	8
2.4. Funkcionalne osobine proteina mahunarki.....	9
2.4.1. Rastvorljivost.....	10
2.4.2. Kapaciteti zadržavanja vode/ulja.....	11
2.4.3. Emulgujuće karakteristike.....	11
2.4.4. Sposobnost penjenja i kapacitet/stabilnost pene.....	12
2.5. Ekstrakcija proteina iz biljnih izvora.....	13
2.5.1. Alkalna ekstrakcija.....	13
2.5.2. Enzimima potpomognuta ekstrakcija proteina.....	14
2.6. Nanobiotehnologija u prehrambenoj industriji.....	16
2.6.1. Proteini kao nanostrukture za unapređenu primenu.....	17
2.6.2. Mehanizmi stvaranja proteinskih nanočestica.....	18
2.6.3. Unapređena primena proteinskih nanočestica.....	19
3. Materijal i metodi.....	23
3.1. Sirovina.....	23
3.2. Hemijski sastav sirovine.....	23
3.3. Enzimski preparati i njihove aktivnosti.....	23
3.4. Priprema proteinskih izolata.....	24
3.4.1. Alkalna ekstrakcija.....	24
3.4.2. Testiranje enzima za pretretman leblebije.....	24
3.4.3. Enzimima potpomognuta alkalna ekstrakcija u pripremi izolata.....	24
3.4.4. Izdvajanje i sušenje proteinskih izolata.....	25
3.5. Priprema frakcija proteina.....	26
3.6. Hemijski sastav proteinskih izolata i frakcija proteina.....	27
3.7. Preparativna hromatografija sa hidrofobnim interakcijama.....	27
3.8. Analitički metodi.....	27
3.8.1. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR).....	27
3.8.2. Aminokiselinski sastav.....	28
3.8.3. Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza.....	28
3.8.4. Rastvorljivost.....	28
3.8.5. Kapaciteti zadržavanja vode i ulja.....	28
3.8.6. Kapaciteti pene i stabilnost pene.....	29
3.8.7. Emulgujuća svojstva.....	29
3.8.8. Površinska hidrofobnost.....	29
3.8.9. Sadržaj ukupnih i rektivnih sulfhidrilnih (SH) grupa.....	30

3.8.10. <i>In vitro</i> antioksidativna aktivnost.....	30
3.9. Priprema proteinskih nanočestica.....	30
3.9.1. Termički tretman.....	30
3.9.2. Ultrazvučni tretman.....	30
3.10. Karakterizacija proteinskih nanočestica.....	31
3.10.1. Mutnoća.....	31
3.10.2. Raspodela veličina čestica.....	31
3.10.3. Stabilnost proteinskih nanočestica.....	31
3.10.4. Površinska hidrofobnost proteinskih nanočestica.....	31
3.10.5. Kapacitet vezivanja linolne kiseline.....	32
3.10.6. Kapacitet vezivanja askorbinske kiseline.....	32
3.11. Statistička obrada eksperimentalnih podataka.....	32
4. Rezultati i diskusija.....	33
4.1. Proteinski izolati leblebije i njihova svojstva.....	33
4.1.1. Karakterizacija polazne sirovine.....	33
4.1.2. Alkalna i enzimima potpomognuta alkalna ekstrakcija proteina leblebije.....	34
4.1.2.1. Testiranje enzima za tretman leblebije pre alkalne ekstrakcije.....	34
4.1.2.2. Efikasnost alkalne i enzimima potpomognutih alkalnih ekstrakcija proteina leblebije.....	36
4.1.3. Hemijski sastav proteinskih izolata leblebije.....	37
4.1.4. Sekundarna struktura proteinskih izolata leblebije.....	38
4.1.5. Aminokiselinski sastav proteinskih izolata leblebije.....	39
4.1.6. SDS poliakrilamidna gel elektroforeza proteinskih izolata leblebije.....	41
4.1.7. Funkcionalne osobine proteinskih izolata leblebije.....	42
4.1.7.1. Rastvorljivost.....	42
4.1.7.2. Kapaciteti zadržavanja vode i ulja.....	44
4.1.7.3. Emulgujuća svojstva i penjenje.....	45
4.1.8. <i>In vitro</i> antioksidativna aktivnost proteinskih izolata leblebije.....	47
4.2. Nanočestice pripremljene iz proteinskih izolata leblebije.....	48
4.2.1. Mutnoća disperzije proteinskih nanočestica.....	48
4.2.2. Raspodela veličina proteinskih nanočestica.....	50
4.2.3. Stabilnost proteinskih nanočestica tokom skladištenja.....	52
4.2.4. Površinska hidrofobnost proteinskih nanočestica.....	54
4.2.5. <i>In vitro</i> antioksidativna aktivnost proteinskih nanočestica.....	55
4.2.6. Kapacitet proteinskih nanočestica za vezivanje linolne kiseline.....	56
4.2.7. Kapacitet proteinskih nanočestica za vezivanje askorbinske kiseline.....	59
4.3. Razdvajanje proteina leblebije preparativnom hromatografijom sa hidrofobnim interakcijama.....	60
4.3.1. SDS PAGE frakcija dobijenih preparativnom HIC tehnikom.....	61
4.3.2. FTIR spektri frakcija dobijenih preparativnom HIC tehnikom.....	62
4.3.3. <i>In vitro</i> antioksidativna aktivnost frakcija dobijenih preparativnom HIC tehnikom.....	63
4.4. Frakcije proteina leblebije i njihova svojstva.....	64
4.4.1. Sekvencijalna ekstrakcija frakcija proteina leblebije.....	65
4.4.2. Hemijski sastav frakcija proteina leblebije.....	65

4.4.3. Sekundarna struktura frakcija proteina leblebije.....	66
4.4.4. Aminokiselinski sastav frakcija proteina leblebije.....	68
4.4.5. SDS-PAGE frakcija proteina leblebije.....	69
4.4.6. Funkcionalne osobine frakcija proteina leblebije.....	70
4.4.6.1. Rastvorljivost frakcija proteina leblebije.....	70
4.4.6.2. Kapaciteti zadržavanja vode i ulja frakcija proteina leblebije.....	71
4.4.6.3. Emulgujuća svojstva i svojstva penjenja frakcija proteina leblebije.....	72
4.4.7. <i>In vitro</i> antioksidativna aktivnost frakcija proteina leblebije.....	75
4.5. Nanočestice pripremljene iz frakcija proteina leblebije.....	75
4.5.1. Mutnoća disperzija proteinskih nanočestica.....	76
4.5.2. Raspodela veličina proteinskih nanočestica.....	77
4.5.3. Stabilnost proteinskih nanočestica tokom skladištenja.....	80
4.5.4. Površinska hidrofobnost proteinskih nanočestica.....	81
4.5.5. Kapacitet proteinskih nanočestica za vezivanja linolne kiseline.....	82
4.5.6. Kapacitet proteinskih nanočestica za vezivanja askorbinske kiseline.....	85
4.5.7. <i>In vitro</i> antioksidativna aktivnost proteinskih nanočestica.....	85
5. Zaključci.....	87
6. Literatura.....	90
7. Prilozi.....	110

Rezime

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su bila usmerena na izdvajanje proteina iz semena leblebije (*Cicer arietinum* L.) konvencionalnim i unapređenim postupcima, i karakterizaciju dobijenih proteinskih izolata u pogledu hemijskog i aminokiselinskog sastava, sadržaja elemenata sekundarne strukture i proteinskog profila. Izdvojenim proteinima su određena funkcionalna svojstva i *in vitro* antioksidativna aktivnost. Pored toga, proteini leblebije su podvrgnuti termičkom tretmanu, sa ciljem dobijanja nanostrukturnih čestica koje su okarakterisane s aspekta veličina i raspodele veličina. Proteinskim nanočesticama je određena površinska hidrofobnost, stabilnost tokom skladištenja i *in vitro* antioksidativna aktivnost, kao i osobine od značaja za njihovu unapređenu primenu kao što su kapaciteti vezivanja hidrofилnih i hidrofobnih supstanci.

Proteini su iz obezmašćenog semena leblebije ekstrahovani konvencionalnim alkalnim postupkom, a pre ove ekstrakcije je urađen tretman sirovine enzimima sa ciljem poboljšanja ekstrakcionog prinosa. U tom smislu je testirano više različitih individualnih i kombinovanih aktivnosti enzima koji razgrađuju ćelijski zid biljaka, na osnovu čega su izabrana dva postupka pretretmana - individualnom α -L-arabinofunadozidazom i kombinacijom endo-ksilanaze i kompleksa celulaza. U izabranim enzimima potpomognutim alkalnim ekstrakcijama postignuta je značajno veća efikasnost postupka, pa su tako pretretmani arabinofuranozidazom, kao i kombinacijom celulaza i ksilanaze doveli do gotovo potpune ekstrakcije proteina iz semena leblebije; ovo je dovelo do povećanja prinosa tako dobijenih proteinskih izolata za više od 25% u odnosu na prinos izolata iz alkalne ekstrakcije bez enzimskog tretmana. Rezultati analize hemijskog sastava su pokazali da su svi izolati imali visok (>80%) sadržaj proteina i nizak sadržaj skroba (< 1%). Na osnovu razlika u aminokiselinskom sastavu zaključeno je da su postojale razlike u proteinskom sastavu dobijenih izolata. Analiza elemenata sekundarne strukture proteina je pokazala razlike u sadržaju α -heliksa i β -ravni/ β -zavoja među proteinskim izolatima, a natrijum-dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza razlike u proteinskim profilima, što je ukazalo na različit sastav izolata u smislu udela različitih frakcija proteina leblebije u njima.

Kada je reč o funkcionalnim i biološkim osobinama, proteinski izolati iz enzimima potpomognutih alkalnih ekstrakcija pokazali su veću rastvorljivost, kapacitete zadržavanja vode i ulja, poboljšane emulgujuće karakteristike i svojstva penjenja, kao i *in vitro* antioksidativnu aktivnost u odnosu na proteinski izolat iz alkalne ekstrakcije. Dobijeni rezultati su ukazali na mogućnost da se izborom i primenom enzima za tretman semena leblebije pre alkalne ekstrakcije može ne samo poboljšati prinos, već i svojstva dobijenog proteinskog izolata, značajna za njegovu upotrebu u prehrambenom matriksu.

Dalja istraživanja bila su usmerena na izdvajanje frakcija proteina leblebije, njihovu karakterizaciju i određivanje funkcionalnih osobina, sa ciljem dubljeg razumevanja karakteristika i svojstava proteinskih izolata dobijenih alkalnim i enzimima potpomognutim alkalnim ekstrakcijama kao njihovih smeša. Sekvencijalnim ekstrakcijama su iz obezmašćenog semena leblebije izolovane albuminska, globulinska i glutelinska frakcija, koje su takođe okarakterisane u pogledu njihovih funkcionalnih i bioloških osobina. Uočljivo je bilo da je najveća rastvorljivost (oko 85%) pod ispitivanim uslovima bila ona frakcije globulina dok je najmanja rastvorljivost (oko 65%) izmerena za frakciju glutelina. Kapaciteti zadržavanja vode i ulja glutelinske frakcije bili su značajno veći od kapaciteta dobijenih za druge dve frakcije. Emulgujuća aktivnost glutelina bila je značajno veća od aktivnosti albumina i globulina, dok su značajno veći rezultati za stabilnost emulzija dobijeni za

globulinsku i albuminsku frakciju. Rezultati kapaciteta i stabilnosti pene su pokazali da su svojstva penjenja glutelina bila većih vrednosti u poređenju sa ovim svojstvima albumina i globulina leblebije. Što se tiče biološke aktivnosti, rezultati su pokazali sličnu *in vitro* antioksidativnu aktivnost frakcija albumina i glutelina, dok je u odnosu na ove dve frakcije globulinska frakcija pokazala značajno niži rezultat. Na osnovu sagledanih svojstava frakcija proteina leblebije, zaključeno je da su superiornija svojstva proteinskih izolata iz enzimima potpomognutih ekstrakcija u odnosu na alkalni bila rezultat razlika u udelima ekstrahovanih proteinskih frakcija u njima, pa samim tim i svojstava koje one poseduju.

Primenom termičkog tretmana formirane su nanostrukture iz dobijenih proteinskih izolata i frakcija proteina leblebije, koje su okarakterisane u pogledu njihovih najvažnijih svojstava i potencijalne primene kao nosača različitih bioaktivnih jedinjenja. Varijacijom vremena trajanja termičkog tretmana i vrednosti pH na kom su pripremane, dobijene su (nano)čestice različitih veličina pripremljene od proteinskih izolata (28 - 290 nm) i frakcija proteina (23 - 405 nm). Termički tretman izazvao je povećanje udela struktura α -heliksa i smanjenje udela β -ravni u poređenju sa netretiranim proteinskim izolatima. Nanočestice pripremljene iz proteinskih izolata dobijenih iz enzimski potpomognutih alkalnih ekstrakcija imale su manje prečnike i veću stabilnost tokom skladištenja, pri većoj pH, u poređenju sa nanočesticama pripremljenim iz alkalnog proteinskog izolata. Pored toga, nanočestice dobijene iz izolata iz ekstrakcije potpomognute kombinacijom celulaza i ksilanaze ispoljile su najveću *in vitro* antioksidativnu aktivnost, dok su nanočestice pripremljene od izolata iz ekstrakcije potpomognute arabinofuranozidazom pokazale superiorniji kapacitet vezivanja linolne kiseline. Rezultati karakteristika nanostrukture dobijenih iz frakcija proteina leblebije su pokazali dobro slaganje superiornijih rezultata nanočestica dobijenih od glutelinske frakcije (najmanje veličine nanočestica, veća stabilnost tokom skladištenja), kao i visoku *in vitro* antioksidativnu aktivnost sa rezultatima za ova svojstva nanočestica pripremljenih od proteinskih izolata iz enzimima potpomognutih ekstrakcija. Dodatno, nanočestice pripremljene od albuminske frakcije pokazale su generalno veći kapacitet vezivanja linolne kiseline, kao složene funkcije veličine i površinske hidrofobnosti, u odnosu na nanočestice iz druge dve frakcije, uz takođe izraženu *in vitro* antioksidativnu aktivnost.

Summary

Research activities within this doctoral dissertation were focused on extraction of proteins from chickpea seeds (*Cicer arietinum* L.) using conventional and advanced procedures, and their characterization in terms of chemical and amino acid composition, analysis of secondary structure and protein pattern. Functional properties and *in vitro* antioxidant activity of obtained protein isolates were determined as well. In addition, chickpea proteins were exposed to thermal treatment, with the aim to produce protein nanostructures, and obtained nanoparticles were characterized in terms of size and size distribution. Surface hydrophobicity, storage stability and *in vitro* antioxidant activity were determined for protein nanoparticles, as well as properties important for their improved application, such as binding capacity of hydrophilic and hydrophobic substances.

Proteins were extracted from defatted chickpea seeds using conventional alkaline procedure, where enzymatic treatments of raw material prior to alkaline extraction were applied in order to improve the extraction yield. In this sense, several different individual and combined enzyme activities, that can break down plant cell walls, were tested and based on results two pretreatment procedures were chosen - individual α -L-arabinofuranosidase and a combination of endo-xylanase and cellulase complex. Alkaline extractions assisted by selected enzymes had significant effect on the efficiency of the procedure; pretreatments with arabinofuranosidase and a combination of cellulase and xylanase led to almost complete extraction of protein from chickpea seeds that resulted in enhancement of the extractability for more than 25% in comparison to alkaline extraction only. Chemical composition analysis confirmed that all protein isolates had high (>80%) protein content and low starch content (< 1%). Analysis of amino acid composition indicated differences in the protein composition between investigated isolates. Secondary structure analysis also showed differences in α -helix and β -sheet/ β -turn content among protein isolates, while sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis showed differences in protein patterns, indicating a different composition of the isolates in terms of the ratio of protein fractions inside them.

When functional and biological properties were analyzed, protein isolates from enzyme-assisted alkaline extractions showed higher solubility, water and oil holding capacities, improved emulsifying and foaming properties, as well as *in vitro* antioxidant activity compared to protein isolate from alkaline extraction. The obtained results indicated possibility that by choosing and applying enzymes for the treatment of chickpea seeds prior alkaline extraction, it is possible not only to improve the yield, but also the properties of the obtained protein isolate, significant for its application in the food matrix.

Further research was focused on extraction of chickpea protein fractions, their characterization and determination of functional properties, with the aim of deeper understanding of the characteristics and properties of protein isolates obtained by alkaline and enzyme-assisted alkaline extractions as their mixtures. By subsequent extraction, albumin, globulin and glutelin fractions were extracted from chickpea seeds and characterized in terms of their functional and biological properties. It is evident that globulin fraction had the highest solubility (about 85%), while the lowest solubility (about 65%) was obtained for glutelin fraction. The WHC and OHC of the glutelin fraction were significantly higher compared to the capacities of the other two. The emulsifying activity of glutelin was significantly higher than that of albumin and globulin, while higher results for emulsion stability were obtained for globulin and albumin fractions. The results of

FC and FS showed that the foaming properties of glutelin are higher compared to the properties of albumin and globulin fractions. Regarding the biological activity, albumin and glutelin fractions expressed similar antioxidant activity, while globulin fraction showed significantly lower result. Based on obtained properties of chickpea protein fractions, it was concluded that superior properties of protein isolates from enzyme-assisted alkaline extraction are result of the differences in the content of extracted protein fractions in them, and therefore properties they possess.

Using heat treatment, nanostructures were produced from protein isolates and protein fractions and characterized in terms of their most important properties and potential application as carriers of various bioactive compounds. By varying time of heat treatment and pH on that they were prepared, (nano)particles with various sizes were obtained for protein isolates (28 - 290 nm) and fractions (23 - 405 nm). Heat caused an increase in the relative amount of α -helix structures and an overall decrease in the amount of β -sheet structures when compared to non-treated chickpea protein/fractions. Nanoparticles prepared from proteins obtained with the assistance of enzymes showed lower particle sizes and higher storage stability at higher pH, compared to nanoparticles prepared from protein extracted with alkali. Additionally, nanoparticles obtained from protein isolate from extraction assisted by combination of cellulases and xylanase showed highest *in vitro* antioxidant activities while nanoparticles prepared from protein isolate obtained from extraction assisted by arabinofuranosidase showed superior binding capacity of linoleic acid. Results of the characteristics of nanostructures obtained from protein fractions showed that there is a good agreement of the superior results of the nanoparticles produced from glutelin fraction (smallest nanoparticle size, better storage stability), as well as high *in vitro* antioxidant activity, with the results of these properties of nanoparticles prepared from protein isolates from enzyme-assisted alkaline extractions. Additionally, nanoparticles prepared from albumin fraction showed generally higher linoleic acid binding capacity, as a complex function of size and surface hydrophobicity, compared to nanoparticles from the other two fractions, with also expressed *in vitro* antioxidant activity.

1. Uvod

Savremeni svet se susreće sa problemom brzorastuće populacije i, s tim u vezi, izazovom da obezbedi dovoljnu količinu hrane za sve članove ljudske zajednice. U tom smislu se naročito izdvaja hrana bogata proteinima, kao izvor komponenata neophodnih za normalno funkcionisanje ljudskog organizma. U novije vreme, sve veća pažnja se posvećuje alternativnim izvorima proteina koji bi mogli da zamene tradicionalne životinjske proteine. S druge strane, primećeno je da ishrana bogata proteinima biljnog porekla ima pozitivan uticaj na smanjenje nivoa lipida u krvi i nema negativnih uticaja na rast holesterola ili razvoj kardiovaskularnih oboljenja za šta su, pretpostavlja se, odgovorni bioaktivni peptidi i aminokiseline iz biljnih izvora. Pored toga, smatra se da proizvodnja proteina iz biljnih izvora ima manji negativan uticaj na životnu sredinu nego ona iz animalnih.

Mahunarke, kao biljna sirovina, predstavljaju jedan od glavnih izvora osnovnih hranljivih sastojaka, uključujući proteine, ugljene hidrate, vlakna, minerale i vitamine, a karakteriše ih i nizak sadržaj zasićenih masti. Među različitim vrstama mahunarki, leblebija (*Cicer arietinum* L.) predstavlja obećavajući izvor za pripremu proteinskih koncentrata i izolata. Kvalitet proteina leblebije ogleda se u visokoj biološkoj vrednosti, dobro uravnoteženom sadržaju aminokiselina i niskom sadržaju antinutritivnih faktora.

Za izdvajanje proteinskih koncentrata ili izolata iz biljnih izvora se koriste različite tehnike među kojima se najčešće spominje konvencionalni alkalni proces. Da bi se povećao prinos ekstrakcije proteina i očuvala njegova biološka i funkcionalna svojstva tokom samog procesa, posebna pažnja je, u poslednje vreme, usmerena na upotrebu enzima koji mogu selektivno depolimerizovati i razgraditi komponente ćelijskog zida. Upotreba enzima odlikuje se i manjom potrošnjom energije, većom efikasnošću procesa ekstrakcije i blagim procesnim uslovima bez negativnog uticaja na strukturu proizvoda. Prema našim saznanjima, upotreba enzima sa ciljem poboljšanja ekstrakcije proteina iz leblebije do sada nije istraživana.

Sveobuhvatno ispitivanje fizičko-hemijskih i funkcionalnih osobina biljnih proteina i proteinskih derivata je fundamentalno za unapređenje njihove upotrebe u proizvodnji hrane i prehrambenih proizvoda sa visokom nutritivnom vrednošću. Upotreba različitih izolata biljnih proteina se uglavnom zasniva na njihovim funkcionalnim svojstvima (rastvorljivost, viskoznost, stvaranje pene, emulgovanje, kapaciteti zadržavanja vode i ulja, itd.). Naime, njihova funkcionalna svojstva proističu iz tzv. „unutrašnjih“ faktora, poput strukture i konformacije proteina, zatim iz tzv. „spoljašnjih“ faktora koji potiču iz okruženja u kom se protein nalazi, kao i postupka izolacije proteina.

U skorije vreme još jedna bitna uloga proteina, važna za njihovu unapređenu upotrebu, se nalazi u fokusu naučne i stručne javnosti; naime, proteini kao biomaterijali imaju mogućnost formiranja nanostrukture. Ove, pak, nanostrukture mogu poslužiti kao nosači različitih bioaktivnih jedinjenja sa ciljem njihovog poboljšanog inkorporiranja u hranu. Proteinske nanostrukture se mogu koristiti kao nosači za različita bioaktivna jedinjenja kao što su vitamini, antioksidanti, masne kiseline, probiotici i farmaceutski proizvodi. Zbog definisane primarne strukture proteina, nanočestice na bazi proteina mogu pružiti različite mogućnosti za modifikaciju i vezivanje različitih jedinjenja.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su bila usmerena na ispitivanje kombinovanih tehnika enzimima olakšane alkalne ekstrakcije proteina iz semena leblebije sa ciljem dobijanja izolata u većem prinosu i sa poboljšanim funkcionalnim i antioksidativnim osobinama. Pored toga, sekvencijalnom ekstrakcijom su izolovane i okarakterisane albuminska, globulinska i glutelinska

frakcija proteina leblebije, sa ciljem dubljeg sagledavanja strukturnih karakteristika, i funkcionalnih i antioksidativnih svojstava proteinskih izolata kao smeša ovih frakcija. Takođe, ispitane su i modifikacije dobijenih proteinskih izolata i frakcija proteina u cilju dobijanja proteinskih nanostrukture koje bi predstavljale nosače pogodne za inkorporiranje različitih bioaktivnih jedinjenja u hranu.



2. Teorijski deo



BILJNI PROTEINI

2.1. Biljni proteini

Opšte je poznato da adekvatna ishrana ljudi zavisi od unosa mnogobrojnih hranljivih materija. Svest o bezbednosti hrane, kao i izazovi sa kojima se susreće sve veća svetska populacija (predviđa se preko devet milijardi ljudi do 2050. godine) kako bi proizvela i distribuirala nutritivno visokovrednu hranu na ekološki održiv i pristupačan način, podstakli su brojna istraživanja među kojima se izdvajaju i istraživanja na polju proteina (Sá et al., 2020; Sim et al., 2021). Proteini predstavljaju kompleksne biomakromolekule, sastavljene od 20 različitih aminokiselina (kao monomera) povezanih peptidnim vezama, koji vrše čitav niz funkcija u organizmu a takođe su i neophodni makronutrijenti u ljudskoj ishrani. Važnost proteina u ishrani je dobro utvrđena - osim što predstavljaju izvor energije i bioaktivnih jedinjenja, ovi makromolekuli su i izvor elemenata za održavanje struktura, zaštitnu ulogu, i odvijanje i regulaciju neverovatnog spektra metaboličkih aktivnosti u organizmu.

Proteini ispunjavaju još jednu važnu ulogu s aspekta ishrane, naime, njihove fizičko-hemijske karakteristike utiču na senzorna svojstva i kvalitet hrane. Nutritivni kvalitet proteina definisan je sadržajem esencijalnih aminokiselina prema utvrđenim standardima (WHO/FAO), zajedno sa zahtevima u pogledu njegove svarljivosti, bioraspoloživosti i čistoće. Značajan izazov predstavlja pronalaženje najpogodnijeg izvora proteina, što, pre svega, zavisi od mnogobrojnih faktora, među kojima se najviše ističu potrebe potrošača, industrijska dostupnost, ekonomičnost, kao i kulturološki elementi (Sá et al., 2020).

Proizvodnja proteina predstavlja glavni izazov današnjice jer tradicionalni životinjski izvori proteina zahtevaju intenzivnu količinu zemljišta i resursa (Calicioglu et al., 2019). Takođe, proteini životinjskog porekla su povezani sa sve većim troškovima, ograničenom raspoloživošću resursa i ugrožavanjem biodiverziteta tokom njihove proizvodnje (Willett et al., 2019). Istraživanja beleže porast rizika od kardiovaskularnih i kancerogenih oboljenja usled konzumiranja proteina životinjskog porekla, što može biti povezano sa većim prisustvom sulfo-aminokiselina u njima (Naghshi et al., 2020). Proteini iz biljnih izvora predstavljaju obećavajuću alternativu prvenstveno zbog svoje duge istorije uzgoja, niže cene proizvodnje (u odnosu na one iz životinjskih) i velike pristupačnosti u mnogim delovima sveta (Sim et al., 2021). Biljni proteini su takođe ekološki održiviji i njihova proizvodnja ima manje negativni uticaj na životnu sredinu nego ona iz animalnih izvora. Postoji nekoliko dobro poznatih izvora biljnih proteina koji mogu poboljšati ljudsku ishranu i pomoći u prevazilaženju navedenih izazova. Među njima se najviše ističu biljni proteini dobijeni iz mahunarki (grašak, leblebija, pasulj, lupin), žitarica (kukuruz, ovas, pšenica, pirinač, kinoa), semena i lišća (čia, susam, lan, semenke bundeve i suncokreta, lišće bambusa i spanaća), orašastih plodova (kikiriki, badem, brazilski i indijski orah), koji su dobro okarakterisani i istraženi (slika 1). Takođe, posebna pažnja usmerena je i na istraživanje ostalih, alternativnih, izvora proteina, kao što su npr. alge, insekti, ali i sporedni proizvodi poljoprivredno-prehrambenog sektora.

Mnoge studije su pokazale da proteini dobijeni iz biljnih izvora poseduju potrebne količine esencijalnih aminokiselina za ljudske potrebe, pa, shodno tome, ovi proteini imaju važnu ulogu u ljudskoj ishrani. Treba uzeti u obzir da u istoj biljnoj vrsti sadržaj proteina može da varira zbog razlika u klimatskom području u kom je odgajana, sastavu zemljišta, nadmorskoj visini, nivou padavina, kao i sorti biljke. Takođe, sastav proteina može da varira od načina i uslova procesa njihovog izdvajanja iz biljne sirovine, koji mogu dovesti do degradacije i promene aminokiselinskog sastava, kako esencijalnih, tako i neesencijalnih aminokiselina. Duboko razumevanje fizičko-

hemijskih i funkcionalnih svojstava biljnih proteina i njihovih derivata je fundamentalno za poboljšanje njihove upotrebe u proizvodnji hrane, kao i u stvaranju novih proizvoda sa visokokvalitetnom nutritivnom vrednošću (Conde *et al.*, 2005).



Slika 1. Najpoznatiji izvori biljnih proteina (Tuamnee, 2022)

Prema nekim procenama zasnovanim na svetskoj populaciji od 7,3 milijardi stanovnika, potražnja za proteinima iznosi oko 202 miliona tona na godišnjem nivou. Međutim, pored povećanja potražnje zbog projektovanog porasta stanovništva od 2,3 milijarde u narednih 30 godina, smatra se da postoje dodatni faktori koji mogu doprineti povećanoj potražnji za proteinima na globalnom nivou a koji proističu iz socio-ekonomskih promena (rast prihoda, urbanizacija, povećana svest o uticaju proizvodnje hrane i njene konzumacije na životnu sredinu i zdravlje ljudi). Dostupne su mnoge strategije kao odgovor na rastuću globalnu potražnju za proteinima, koje obuhvataju prvenstveno tehnološki napredak u proizvodnji i preradi, promene u poljoprivredno-prehrambenom sektoru i promene u obrascima potrošnje proteina (Henchion *et al.*, 2017).

Trenutno, biljni izvori dominiraju u podmirivanju potrebe za proteinima na globalnom nivou (57%) a zatim ih slede meso (18%), mlečni proizvodi (10%), riba i školjke (6%), kao i drugi proizvodi životinjskog porekla (9%). Među biljkama, upotreba mahunarki sa visokim sadržajem proteina i prisustvom mnogih drugih bioaktivnih jedinjenja poznatih struktura i funkcija postaje sve popularnija. Mahunarke takođe imaju značajnu ulogu u prevazilaženju izazova povezanih sa nedovoljnim unosom proteina u zemljama u razvoju i nerazvijenim zemljama sveta, gde komercijalno obogaćena hrana, raznovrsna ishrana i dodaci ishrani nisu dostupni svima i u dovoljnoj meri (Gupta *et al.*, 2021; Henchion *et al.*, 2017).

2.2. Leblebija kao izvor proteina

Biljke iz porodice mahunarki (*Fabaceae*) se gaje na značajnim površinama u mnogim regionima širom sveta. Njihovi plodovi su od davnina poznati kao važne namirnice u ljudskoj ishrani, prvenstveno zbog svojih nutritivnih svojstava, niske cene i lakog skladištenja (*Faridy et al.*, 2020). Mahunarke su nazvane „hranljivo seme za održivu budućnost“, a 2016. godina je bila proglašena za „Međunarodnu godinu mahunarki“, od strane Ujedinjenih nacija i Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO, 2016). Predstavljaju bogat izvor proteina, dijetetskih vlakana i mikronutrijenata koji imaju brojna korisna delovanja na ljudsko zdravlje.

Leblebija (*Cicer arietinum* L.), još poznata pod nazivom slanutak, slani pasulj ili naut, je važna mahunarka koja se uzgaja i konzumira u preko pedeset zemalja sveta, i to najviše na indijskom potkontinentu, Severnoj Africi, Bliskom Istoku, Americi i Australiji. Svetska proizvodnja leblebije u 2020. godini iznosila je 15,08 miliona tona (FAOSTAT, 2020). Indija je najveći svetski proizvođač leblebije (slede je Turska i Australija) sa učešćem od 66,19%, u isto vreme čineći 86,03% ukupne proizvodnje leblebije u Aziji (*Kaur and Prasad*, 2021a). Na globalnom nivou, leblebija je treća najviše uzgajana mahunarka, odmah nakon pasulja i graška koji se nalaze na prvom i drugom mestu (FAOSTAT, 2020). *Cicer arietinum* L. je jedina kultivisana vrsta iz roda *Cicer*. Svrstava se u porodicu *Fabaceae* i potporodicu *Faboideae*. To je zeljasta, jednogodišnja biljka koja je otporna na sušu i hladnoću, i koja tokom rasta izgleda kao mali žbun sa granama koje se šire iz osnove stabla.

Postoje dva tipa leblebije koja se razlikuju po veličini zrna, njegovom obliku i boji (slika 2). Jedan, Desi tip karakteriše relativno manje seme (80 – 350 mg) ugaonog oblika, grube površine sa tamnim semenim omotačem. Biljka je izuzetno niskog rasta sa karakterističnim ljubičastim cvetovima i dokazanim prisustvom antocijana. Drugi, Kabuli tip karakteriše relativno veliko seme (100 – 750 mg) glatke površine sa lako uočljivim produžetkom i bež obojenim semenskim omotačem. Ime je dobio pre dva veka kada je ova vrsta stigla do Indije preko Kabula (glavni grad Avganistana). Biljke ovog tipa variraju od srednje visokih do veoma visokih a karakterišu ih upečatljivi beli cvetovi i odsustvo antocijana (*Hirdyani*, 2015). Kabuli tip se najviše konzumira na Mediteranskom području dok je Desi tip najviše rasprostranjen u ishrani stanovnika Bliskog Istoka, Severne Afrike i Australije (*Faridy et al.*, 2020). Dokazi ukazuju na naknadnu evoluciju tipa Kabuli u odnosu na Desi, koja se ogleda prvenstveno u svetlijoj boji zrna ali takođe i u njegovom boljem kvalitetu (*Moreno and Cubero*, 1978).

Kabuli tip



Desi tip

Slika 2. Seme dva različita tipa leblebije

2.2.1. Nutritivni sastav semena leblebije

Seme leblebije je dobar izvor ugljenih hidrata i proteina, koji zajedno čine oko 80% ukupne mase semena. Poznato je da leblebija sintetizira i skladišti skrob, kao rezervni polisaharid, u kotiledonima. Sadržaj skroba varira od 30,8% do 37,9% suve materije, pri čemu tip Kabuli ima više nekih mono- i disaharida (saharoza, glukoza i fruktoza) u poređenju sa tipom Desi (*Jukanti et al.*, 2012). Žitarice, kao što je pšenica, imaju veću količinu skroba u poređenju sa leblebijom, ali leblebiju odlikuje veći sadržaj amiloze (30 – 40%, prema 25% u pšenici) i s tim niži glikemijski indeks. Procenat ukupnih vlakana (TDF) u leblebiji varira od 18 do 22 g/100 g, s tim da je sadržaj rastvorljivih (SDF) i nerastvorljivih (IDF) vlakana oko 4 – 8 g/100 g i 10 – 18 g/100 g sirovog ploda leblebije, redom. Sadržaj ukupnih i nerastvorljivih dijetetskih vlakana kod leblebije tipa Desi je veći nego kod tipa Kabuli zbog postojanja debljeg omotača semena (*Rincón et al.*, 1998). Ukupni sadržaj masti u sirovom semenu leblebije je relativno nizak i kreće se od 2,7% do 6,48% (*Alajaji and El-Adawy*, 2006; *Kaur et al.*, 2005). Leblebija je bogata nutritivno važnim nezasićenim masnim kiselinama kao što su linolna (51.2% od ukupnih masnih kiselina) i oleinska kiselina (32.6% od ukupnih masnih kiselina). Ca, Mg, P i, posebno, K su takođe prisutni u plodu leblebije. Leblebija je dobar izvor važnih vitamina kao što su riboflavin, niacin, tiamin i folna kiselina, dok bitni karotenoidi prisutni u leblebiji uključuju β -karoten, lutein, zeaksantin, likopen i α -karoten (*Jukanti et al.*, 2012).

2.3. Protein leblebije

Seme leblebija sadrži oko 18 - 22% proteina (računato na suhu materiju) i predstavlja izuzetan izvor ove važne klase biomolekula, ponajviše za vegetarijansku i vegansku populaciju (*Jukanti et al.*, 2012; *Kaur and Prasad*, 2021b). Sadržaj proteina u semenu leblebije varira u zavisnosti od genetskih faktora i klimatskih uslova kojim je biljka izložena tokom kultivacije (*Cobos et al.*, 2016). Seme leblebije sadrži dvostruko veću količinu proteina u odnosu na žitarice, dok je poređenje sadržaja esencijalnih aminokiselina pokazalo da je protein leblebije u tom pogledu superiorniji od proteina kukuruza i pšenice, i ekvivalentan proteinu pirinča (*Smartt and Nwokolo*, 2012). Važnost proteina leblebije ogleda se u njegovom dobro izbalansiranom sadržaju aminokiselina. Utvrđeno je da su asparaginska kiselina, glutaminska kiselina i arginin najzastupljenije aminokiseline u proteinima Kabuli i Desi tipa, kao i da je ovaj protein značajan izvor lizina. Deficitarne aminokiseline uključuju prvenstveno metionin i cistein, a zatim slede valin, treonin i triptofan (*Iqbal et al.*, 2006). Nedostatak aminokiselina koje sadrže sumpor se može nadoknaditi dodavanjem žitarica svakodnevnoj ishrani koje su bogate ovim aminokiselinama (*Hirdyani*, 2015). Kao još jedna od bitnih prednosti proteina leblebije ističe se njihova visoka bioraspoloživost i dobra svarljivost (*Faridy et al.*, 2020). Plod leblebije tipa Kabuli ima veću *in vitro* svarljivost proteina u poređenju sa tipom Desi i ona iznosi od 34% do 76% (*Sánchez-Vioque et al.*, 1999).

Prema vrsti proizvoda, proteini leblebije su dostupni u vidu koncentrata i izolata, među kojima, prema podacima iz 2018, izolati imaju veći udeo, tj. više od 50% (*Boukid*, 2021). Proteini leblebije poseduju fizičko-hemijska, funkcionalna i strukturna svojstva koja su uporediva sa onima kod proteina drugih mahunarki (*Boye et al.*, 2010b), što ih čini pogodnim za upotrebu u brojnim prehrambenim proizvodima (*Shevkani et al.*, 2019). Još neke od prednosti za primenu ovih proteina obuhvataju neutralan ukus i odsustvo toksina i alergena. Proteini leblebije se najčešće primenjuju u proizvodima koji su zamena za mesne proizvode ili alternativa mlečnim, zatim u dečijoj hrani i

pekarskim proizvodima, prvenstveno zbog moguće netolerancije na laktozu i osetljivosti na gluten (Boukid, 2021). Takođe, ispitivanje proteina leblebije, kao mogućih proteinskih suplemenata ili nosača hranljivih materija u prehrambenoj industriji, nagovestilo je novo polje primene ovih makromolekula (Boukid, 2021).

Pored brojnih osobina koje im omogućavaju upotrebu u prehrambenoj industriji, protein leblebije i njegovi hidrolizati pokazali su i značajana bioaktivna svojstva, među kojima su najizraženija antioksidativna, antiinflamatorna, antihipertenzivna, antikancerogena, kao i antifungalna aktivnost (Boukid, 2021; Tiwari et al., 2020). Uzimajući u obzir potencijal proteina leblebije i njegovih derivata, kao mogućih novih sastojaka hrane, koji takođe imaju i blagotvorno delovanje na ljudsko zdravlje, može se očekivati je da će industrijska proizvodnja proizvoda na bazi proteina leblebije u budućnosti imati trend rasta (Boukid, 2021).

2.3.1. Frakcije proteina leblebije

Proteini leblebije se mogu frakcionisati u pet grupa - globuline (rastvorljivi u rastvoru soli), albumine (rastvorljivi u vodi), prolamine (rastvorljivi u alkoholu), gluteline (rastvorljivi u kiselinama/alkalijama) i rezidualne proteine (Chavan et al., 1987). Procentualni sastav proteina leblebije pokazuje najveći udeo globulina (~56%), zatim glutelina (~18%), albumina (~12%) i nešto manji prolamina (~3%), dok ostatak predstavljaju rezidualni proteini (Singh and Jambunathan, 1982). Proteini leblebije imaju veći sadržaj glutelina u poređenju sa ostalim mahunarkama (Chang et al., 2011).

Albumini

Albuminska frakcija predstavlja bogat izvor esencijalnih aminokiselina, posebno sulfoaminokiselina i aminokiselina koje sadrže azot u bočnoj grupi (triptofan i lizin), i stoga imaju veću nutritivnu vrednost u poređenju sa globulinskom frakcijom (Liu et al., 2008). Zbog ovih karakteristika, albumini u proteinima mahunarki mogu prirodno da dopune aminokiselinski sastav globulina. Frakcija albumina igra nezamenljivu, značajnu ulogu u semenu leblebije jer uključuje većinu enzimskih i metaboličkih proteina (Singh et al., 2008). Generalno, većina proteina albumina ima neke fiziološke funkcije, kao što su biokatalitičke aktivnosti lipoksigenaza, glikozidaza, ili proteaza kao enzima uključenih u razgradnju rezervnih proteina (Vioque et al., 1999). Drugi albumini, kao što su inhibitori proteaza ili lektini, su uključeni u odbrambene mehanizme biljke (Gueguen and Cerletti, 1994). 2S albumin proteina leblebije (~20 kDa) poznat je kao lektin i sastoji se od dva polipeptida veličine od 10 i 12 kDa (Vioque et al., 1999).

Globulini

Globulini su glavni rezervni proteini leblebije i sastoje se od dve velike grupe, 11S proteina legumina i 7S proteina vicilina (Chang et al., 2011). Legumin ima ulogu glavnog skladišnog proteina, i predstavlja izvor energije, ugljenika i redukovano azota za klijavost i razvijanje semena kod leblebije. Legumin čini oko 64% ukupnog sadržaja proteina i 97% globulina u semenu leblebije (Plietz et al., 1980). Legumin leblebije se sastoji od šest α - i β -podjedinica koje povezane čine triagonalnu antiprizmu. Svaki α -lanac je povezan za β -lanac disulfidnim vezama. β -Lanci predstavljaju hidrofobno jezgro proteina, dok su hidrofilni α -lanci orijentisani ka spoljašnjosti molekula (Bhagyawant and Srivastava, 2015). Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamid-gel elektroforeza (SDS-PAGE) je pokazala da glavne proteinske frakcije leblebije imaju podjedinice veličine od 46,5 do 39,8 kDa, i od 25,3 do 24,3 kDa, na osnovu čega je zaključeno da ove

podjedinice verovatno predstavljaju α - i β -podjedinice 11S proteina, odnosno legumina (Sánchez-Vioque *et al.*, 1999).

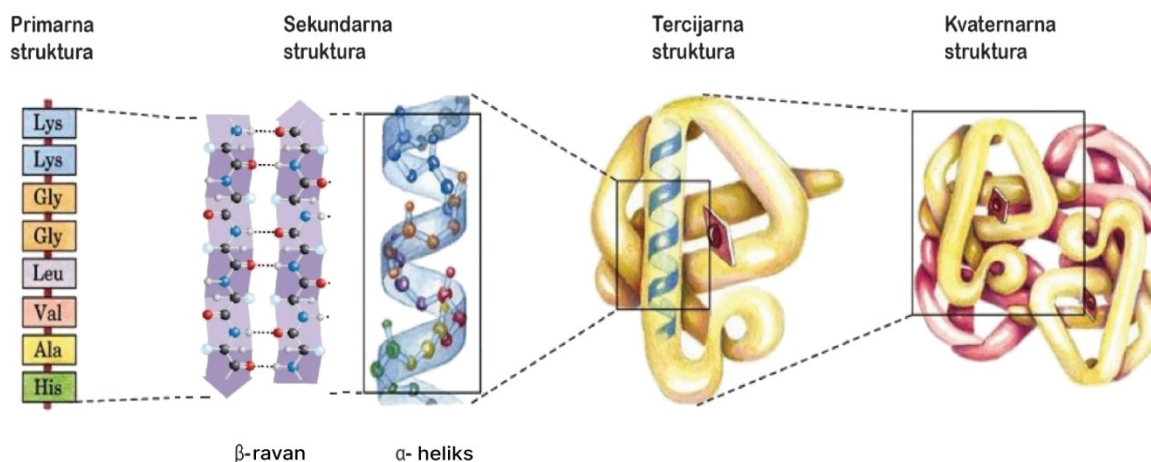
U poređenju sa leguminom, vicilin nije detaljno istražen. Poznato je da su vicilini trimerni proteini koji ne sadrže cistein, pa samim tim ne poseduju ni disulfidne veze (Shewry *et al.*, 1995). Boulter (1983) je definisao vicilinsku grupu kao proteinsku frakciju koja se sastoji uglavnom od podjedinica veličine 50 kDa i niza polipeptidnih lanaca nižih molekulskih masa (33 kDa, 29 kDa, 13 kDa i 12,5 kDa).

Glutelini

Glutelinska frakcija čini 18,1% ukupnih proteina leblebije; dominantna je proteinska frakcija u omotaču semena leblebije (33,2%), dok u kotiledonima i embrionu oko 20% proteina spada u gluteline (Singh and Jambunathan, 1982). Glutelini pripadaju porodici 11–12S globulina; strukturno su veoma slični globulinima (Chang *et al.*, 2011). Sačinjavaju ih podjedinice veličine od oko 55 kDa, koje se mogu posttranslaciono cepati i dati kisele i bazne (23 kDa i 20 - 22 kDa, redom) polipeptidne lance povezane jednom disulfidnom vezom (Chang, 2006; Shotwell, 1999). Glutelinska frakcija, kao i albuminska, u svom aminokiselinskom sastavu sadrži veću količinu metionina i cisteina. Malo je dostupnih informacija o karakterizaciji glutelina, pre svega o njegovoj aminokiselinskoj sekvenci, biološkim i funkcionalnim svojstvima.

2.3.2. Elementi sekundarne strukture proteina mahunarki

Ključni koncept u razumevanju kako proteini funkcionišu izveden je iz njihove strukture. Struktura proteina može da ima četiri nivoa organizacije (slika 3), koji su određeni redosledom povezivanja njihovih monomernih gradivnih blokova – aminokiselina, a to su primarna, sekundarna, tercijarna i kvaternarna struktura (Alberts *et al.*, 2014).



Slika 3. Struktura proteina prikazana na četiri nivoa organizacije, modifikovana prema Nelson and Cox (2004)

Primarna struktura proteina predstavlja linearni redosled aminokiselina koje formiraju polipeptidni lanac. Ova struktura nastaje kovalentnim povezivanjem pojedinačnih aminokiselina preko peptidnih veza (Schmidt, 2006). **Sekundarna struktura** proističe iz primarne strukture i predstavlja konformaciju tj. prostorni raspored polipeptidnog lanca, stabilizovan vodoničnim vezama

koje se formiraju između karbonilnog kiseonika jedne i amidnog vodonika druge peptidne veze; na taj način se delovi “kičme” polipeptidnog lanca savijaju u jednu ili više dobro definisanih sekundarnih struktura kao što su α -heliks i β -ravan. **Tercijarna struktura** se odnosi na ukupnu konformaciju polipeptidnog lanca tj. trodimenzionalni raspored svih njegovih aminokiselinskih ostataka. Za razliku od sekundarne strukture, koja je stabilizovana vodoničnim vezama, tercijarna struktura je prvenstveno stabilizovana hidrofobnim interakcijama između nepolarnih bočnih lanaca, disulfidnim vezama između cisteinskih ostataka i drugim različitim interakcijama. Tercijarna struktura proteina nije rigidno fiksirana već podleže kontinuiranim i malim fluktuacijama. Ove varijacije u strukturi imaju važan uticaj na karakteristike i funkciju proteina (*Ji and Li, 2010*). **Kvaternarna struktura**, kao četvrti nivo strukturne organizacije proteina, opisuje broj (stehiometrija) i relativne pozicije podjedinica u multimernim proteinima. Ova struktura se odnosi na ukupan prostorni raspored polipeptidnih podjedinica unutar molekula ovakvih, složenih proteina.

Kada je reč o sekundarnoj strukturi proteina mahunarki, u poređenju sa onom proteina životinjskog porekla, poznato je da je karakteriše viši sadržaj β -ravni, β -lanaca i β -zavoja, dok je α -heliks prisutan s nižim udelom (*Carbonaro et al., 2015*). Po sadržaju elemenata sekundarne strukture, razlike postoje i između proteina mahunarki i ostalih biljnih proteina; tako je pokazano da je veći udeo β -konformacija i manji udeo α -heliksa kod proteina mahunarki u poređenju sa proteinima ječma, dok globulini pirinča i proteini ovska pokazuju veći ili donekle sličan sadržaj β -ravni/ β -zavoja kada se porede sa proteinima mahunarki (*Shevkani et al., 2019*). Za većinu mahunarki sadržaj α -heliksa se kreće u opsegu od 18% do 20%, čak i niže kod soje (11,8%), dok veće vrednosti udela ovog elementa strukture imaju proteini ječma i pšenice - 28% i 29%, redom (*Carbonaro et al., 2012*). U skladu sa ovim, proteini mahunarki mogu da imaju više nego dvostruko niži odnos α -heliks/ β -ravan u odnosu na proteine žitarica (0,47 i 1,1, redom).

I proteini iz različitih mahunarki (pasulj, grašak, sočivo, leblebija, itd.) se razlikuju po svom sastavu i strukturi. Poznato je da relativni udeo različitih elemenata sekundarne strukture proteina mahunarki varira među različitim sortama (*Shevkani et al., 2019*). Najmanje 30% celokupne sekundarne strukture proteina soje i sočiva sačinjavaju β -ravni, dok su kod leblebije i pasulja prisutne značajno veće vrednosti - 37,2% i 43,6%, redom (*Carbonaro et al., 2012*).

Pokazano je da stabilnost proteina zavisi od odnosa elemenata sekundarne strukture, pa su tako proteini mahunarki sa relativno većim sadržajem β -struktura termički stabilniji i denaturišu se na višim temperaturama u poređenju sa proteinima koji poseduju veći sadržaj α -heliksa (*Carbonaro et al., 2012; Shevkani and Singh, 2014*). Preovlađujući udeo β -struktura u sekundarnoj strukturi takođe doprinosi smanjenju svarljivosti ovih proteina. Utvrđeno je da visok sadržaj β -ravni ograničava pristup proteolitičkim enzimima i dovodi do niže svarljivosti. Upotreba različitih metoda (termički tretman, tretman mikrotalasima, ekstrudiranje itd.) dovodi do smanjenja sadržaja β -ravni i povećanja digestibilnosti proteina iz mahunarki (*Drulyte and Orlien, 2019*).

2.4. Funkcionalne osobine proteina mahunarki

Osim biološke aktivnosti i važne nutritivne uloge, proteini značajno doprinose i tehnološkim i senzornim karakteristikama prehrambenih proizvoda. Naime, naklonjenost potrošača prema hrani često se zasniva na njenim senzornim atributima kao što su izgled, boja, ukus i tekstura. Funkcionalna uloga proteina koja doprinosi kvalitetu prehrambenog proizvoda ne proizilazi iz

jednog fizičko-hemijskog svojstva, već je to složena interakcija više svojstava odjednom (*Hettiarachchy*, 1994).

Funkcionalne osobine direktno su povezane sa fizičkim, hemijskim i konformacionim karakteristikama proteina, koje prvenstveno uključuju veličinu i oblik molekula, aminokiselinski sastav i sekvencu, kao i postojanje i raspodelu naelektrisanja. Karakteristike proteina koja utiču na funkcionalnost uključuju i odnos hidrofilnosti/hidrofobnosti u molekulu, distribuciju elemenata sekundarne strukture (npr. α -heliks, β -ravan i aperiodične strukture), tercijarni i, ako postoji, kvarternarni raspored polipeptidnih segmenata, inter- i intra kovalentne veze (npr. disulfidne veze) i rigidnost/fleksibilnost proteina kao odgovor na spoljašnje uslove (*Damodaran and Paraf*, 1997).

Takođe, na funkcionalnost proteina bitno utiču i procesni uslovi, uslovi medijuma u kome se proteini nalaze, kao i njihove interakcije sa drugim sastojcima u prehrambenom sistemu. Procesni uslovi koji mogu promeniti funkcionalna svojstva proteina uključuju zagrevanje, sušenje, zamrzavanje i mešanje. Uslovi medijuma koji utiču na funkcionalnost su jonska jačina rastvora, pH vrednost, vrste prisutnih soli i oksidaciono-redukcioni potencijal. Pošto su prehrambeni sistemi veoma složeni, funkcionalnost proteina se proučava u model sistemima gde se procesni uslovi, kao i mnoge interakcije sa drugim sastojcima hrane, mogu kontrolisati u cilju smanjenja njihovog štetnog delovanja (*Hui*, 2006).

Najvažnija funkcionalna svojstva proteina koja imaju značajnu primenljivost u prehrambenim sistemima podrazumevaju rastvorljivost, sposobnost bubrenja i zadržavanja vode, svojstva stvaranja pene i njena postojanost, sposobnost geliranja, emulgujuće karakteristike i sposobnost vezivanja ulja (*Boye et al.*, 2010a). Proteini imaju sposobnost da deluju kao matriks koji zadržava vodu, lipide, šećere, arome i druge sastojke. Izražena je i njihova multifunkcionalnost, u smislu posedovanja različitih funkcionalnih uloga koje može imati protein u datom prehrambenom proizvodu. Poznavanje funkcionalnih osobina proteina je ključno za razvoj novih proizvoda ali i za poboljšanje postojećih (*Hui*, 2006).

2.4.1. Rastvorljivost

Visoka rastvorljivost proteina olakšava njegovu inkorporaciju u prehrambene sisteme i omogućava visoku funkcionalnost u primenama u kojima su potrebni procesi geliranja, emulgovanja i stvaranja pene (*Zayas*, 1997). Rastvorljivost proteina određena je njegovom primarnom strukturom, tj. redosledom aminokiselina koje učestvuju u formiranju polipeptidnog lanca. Odnos hidrofilnosti/hidrofobnosti, koji zavisi od aminokiselinskog sastava a posebno od bočnih grupa aminokiselina na površini proteina, u najvećoj meri utiče na rastvorljivost proteina. Veća rastvorljivost je direktno povezana sa prisustvom malog broja hidrofobnih ostataka, kao i postojanjem većeg neto naelektrisanja koje se javlja pri pH vrednosti iznad i ispod izoelektrične tačke proteina. U oba slučaja prisustvo izraženog površinskog naelektrisanja će dovesti do intermolekulskog odbijanja i jače hidratacije, pa samim tim i poboljšane rastvorljivosti (*Damodaran and Paraf*, 1997). Shodno tome, površinska hidrofobnost i površinska hidrofilnost su karakteristike proteina koje predstavljaju najvažnije faktore koji određuju njegovu rastvorljivost. Takođe, na rastvorljivost proteina utiču i faktori koji potiču od medijuma u kome se protein nalazi i to prvenstveno jonska jačina, vrsta rastvarača, pH vrednost rastvora, a treba spomenuti i uticaj temperature (*Zayas*, 1997).

Globulini mahunarki su relativno hidrofobni po prirodi i imaju tendenciju ka smanjenoj rastvorljivosti na pH blizu svoje izoelektrične tačke (pH 4 – 6), ali pokazuju nagli porast

rastvorljivosti kada se pH vrednost pomeri ka više kiseloj ili alkalnoj sredini. *Boye et al.* (2010b) su izmerili veću rastvorljivost proteina iz mahunarki pri pH vrednostima u intervalima od 1 do 3 i od 7 do 10. Kada se porede literaturni podaci za rastvorljivost proteina mahunarki (određena kao njihova najveća vrednost), pokazano je da onaj iz pasulja ima najmanju rastvorljivost (61,4%) dok sojin protein ima najveću (96,5%) (*Singhal et al.*, 2016). Proteine izolovane iz graška, sočiva i leblebije takođe karakteriše dobra rastvorljivost (> 90%). Pored tipa mahunarki, primećeno je da tehnika koja se koristi za ekstrakciju proteina takođe može uticati na rastvorljivost; na primer, proteinski izolati graška ili leblebije, pripremljeni uz pomoć izolektrične precipitacije, pokazali su veću rastvorljivost od onih pripremljenih metodom ultrafiltracije (*Boye et al.*, 2010b).

2.4.2. Kapaciteti zadržavanja vode i ulja

Kapacitet zadržavanja vode/ulja predstavlja masu vode/ulja koja se može zadržati po gramu proteina. Voda se obično vezuje za površinu proteina putem uspostavljanja vodoničnih veza. Voda vezana za površinu proteina na ovakav način formira "jednoslojni" vodeni omotač koji je čvrsto povezan sa proteinom. Koncentracija proteina, temperatura, vrsta i koncentracija soli, kao i stepen denaturacije proteina imaju veliki uticaj na kapacitet zadržavanja vode (WHC) ovih biomolekula (*Hui*, 2006). Vrednosti WHC, od najniže 0,6 g/g pa sve do 4,9 g/g, su dobijene u brojnim istraživanjima (*Boye et al.*, 2010b; *Fernández-Quintela et al.*, 1997; *Kaur and Singh*, 2007) za proteinske izolate ili koncentrate iz mahunarki kao što su leblebija, grašak, pasulj ili sočivo, što ukazuje da karakteristike proteina zavise od vrste mahunarki, pa stoga i određuju ovo njegovo svojstvo.

Lipidi i proteini intereaguju vezivanjem alifatičnih lanaca lipida i nepolarnih bočnih lanaca aminokiselina; stoga, proteini sa većom hidrofobnošću imaju tendenciju ka većem zadržavanju ulja (*Lam et al.*, 2018). Delimično odvijanje molekula proteina i njegova denaturacija ima za posledicu izlaganje velikog broja hidrofobnih grupa prema okruženju, čime se olakšava formiranje odgovarajućeg matriksa za zadržavanje kapljica ulja (*Taghi et al.*, 2020). Na vrednosti kapaciteta zadržavanja ulja najviše utiče struktura matriksa načinjenog od molekula proteina, vrsta prisutnog lipida, kao i karakteristike lipida (*Zayas*, 1997). Proteini iz mahunarki pokazuju dobre vrednosti kapaciteta zadržavanja ulja koji se kreću se u intervalu od 3,5 g/g do 6,8 g/g (*Keskin et al.*, 2022). Najveći OHC dobijen je za sočivo (6,37 g/g) i pasulj (5,59 g/g), dok su nešto niže vrednosti prijavljene za leblebiju i soju (5,37 g/g) i grašak (4,84 g/g) (*Lafarga et al.*, 2020).

2.4.3. Emulgujuće karakteristike

Emulzije se definišu kao disperzije dve tečnosti koje se ne mešaju, u kojima je jedna od tečnosti dispergovana u drugoj u vidu malih kapljica. Emulzije u prehrambenoj industriji mogu biti tipa ulje u vodi (O/W) ili voda u ulju (W/O). Ove koloidne disperzije su termodinamički nestabilne i odmah se razdvajaju u dve faze ukoliko surfaktant nije prisutan. Proteini, koji su amfilni biomolekuli i stoga sposobni da formiraju kohezivne viskoelastične filmove na granici faza vazduh/voda i ulje/voda, smatraju se efikasnim surfaktantima koji mogu da pomognu u formiranju i stabilizaciji različitih emulzija (*Damodaran and Paraf*, 1997). Proteini stabilizuju kapljice ulja u emulzionom sistemu, uglavnom kroz dva glavna fenomena - smanjujući međufazni površinski napon između ulja i vode, i usporavajući koalescenciju kapljica tokom emulgovanja formiranjem međufaznog filma (čime se favorizuje efekat njihovog odbijanja) (*Güell et al.*, 2017). Ova sposobnost proteina je od posebnog značaja za njihovu primenu kao emulgatora u prehrambenoj

industriji. Osobine koje se najviše koriste za opisivanje emulgujućih svojstava proteina predstavljaju indeks emulgjuće aktivnosti (EAI) i indeks emulgjuće stabilnosti (ESI).

Proteini mahunarki pokazali su se kao efikasni emulgatori za pripremanje emulzija tipa ulja u vodi (O/W). Tako su *Aluko et al.* (2009) potvrdili da su proteinski izolati graška bolji emulgatori u poređenju sa sojinim proteinima. Proteinski izolati leblebije i sočiva, izolovani metodom izoelektrične precipitacije, su pokazali emulgjuće osobine uporedive sa sojinim proteinom, dok su izolati iz graška i pasulja bili superiorniji u ovom pogledu (*Karaca et al.*, 2011). Dokazano je da frakcija 7S poseduje bolja svojstva emulgovanja u odnosu na 11S frakciju, u svim globulinima mahunarki (*Kimura et al.*, 2008). Takođe, potvrđeno je da emulgjuće osobine proteinskih koncentrata ili izolata mahunarki zavise od vrste mahunarke i metoda koji se koristi tokom njihove pripreme (*Tiwari et al.*, 2020).

2.4.4. Sposobnost penjenja i kapacitet/stabilnost pene

Proteini predstavljaju najčešće korišćene biopolimere za stabilizaciju granice faza vazduh/voda u prehrambenoj industriji. Trend da se koriste proteini umesto surfaktanata male molekulske mase (LMWS) nije vođen samo svojstvom proteinskih molekula da formiraju i stabilizuju pene, već i konstantno rastućim brojem potrošača koji su svesni zdravstvene bezbednosti hrane i zahtevaju prehrambene proizvode bez prisustva sintetičkih aditiva kakvi su LMWS (*Amagliani et al.*, 2021). Za optimalno formiranje pene, protein treba da bude rastvorljiv u tečnoj fazi i da bude sposoban za brzu migraciju i orijentaciju ka formiranju međufaznog filma oko nastajućih gasnih mehurića (*Kinsella*, 1981). Svojstvo stvaranja pene kod proteina je u korelaciji sa njegovom sposobnošću da smanji površinski napon na granici faza između vazduha i tečnosti. Rastvorljivost proteina u vodenoj fazi je osnovni preduslov i jedan od glavnih kriterijuma za izbor proteinskih izolata koji će se koristiti kao sredstva za penjenje, pošto je poznato da proteini koje karakteriše niska rastvorljivost pokazuju lošu funkcionalnost u prehrambenim sistemima (*Zayas*, 1997).

Proteini mahunarki pokazali su, pored ostalih navedenih funkcionalnih osobina, i dobre osobine penjenja. Sojin protein pokazao je značajno veći kapacitet pene (FC) u odnosu na proteine boba i graška, dok je stabilnost pene bila uporediva sa onom dobijenom sa proteina graška (*Fernández-Quintela et al.*, 1997). Takođe, dokazano je da proteini leblebije i sočiva poseduju dobre osobine penjenja, te se mogu koristiti u različitim prehrambenim proizvodima (*Boye et al.*, 2010b; *Suliman et al.*, 2006). Gubitak albumina tokom većine postupaka ekstrakcije proteina može biti štetan za svojstva penjenja proteinskih izolata. *Sathe and Salunkhe* (1981) su izvestili da albumini iz pasulja imaju vrednost kapaciteta pene koja je dvostruko veća od one za globuline iz istog izvora. Globulini pojedinih mahunarki se takođe razlikuju po svojstvima penjenja; tako legumin iz graška karakteriše veći kapacitet pene (FC) u odnosu na vicilin, ali je utvrđeno da vicilin proizvodi stabilniju penu (*Koyoro and Powers*, 1987). Odsustvo disulfidnih veza u vicilinu omogućava povećanu fleksibilnost proteina, potrebnu za održavanje strukture pene. Generalno gledano, proteini mahunarki poseduju veliki potencijal za primenu u proizvodnji jestivih pena i emulzija, što može biti od velikog značaja za razvoj velikog broja inovativnih proizvoda pogodnih za one koji se odluče da ne konzumiraju hranu životinjskog porekla.



EKSTRAKCIJA PROTEINA IZ BILJNIH IZVORA



2.5. Ekstrakcija proteina iz biljnih izvora

Poslednjih godina postoji veliko interesovanje za načine izdvajanja biljnih proteina, zbog njihove sve intenzivnije primene u prehrambenoj i nekim drugim granama industrije. U ekstrakciji se primenjuju različiti metodi kako bi se efikasnost izolovanja proteina iz pojedinih delova biljaka učinila što je moguće većom. Proteini se obično ekstrahuju iz biljnih sirovina korišćenjem vodenih i organskih rastvarača (Kumar *et al.*, 2021). Metodi ekstrakcije vodenim rastvaračima (uključujući rastvore soli, kiselina i alkalija) se obično koriste zbog velike rastvorljivosti i pozitivnog uticaja na stabilnost proteina. Proteini koji su vezani za lipide i proteini sa mnogo nepolarnih bočnih lanaca ekstrahuju se uz pomoć nekih organskih rastvarača, jer oni poput etanola, acetona i butanola imaju izraženu lipofilnost uz određen stepen hidrofilnosti. Međutim, ovi rastvarači mogu da dovedu do denaturacije proteina tokom ekstrakcije (Cui *et al.*, 2017). U poređenju sa organskim, ekstrakcija vodenim rastvaračima je pogodnija i lakša za primenu.

Izbor odgovarajućih uslova za ekstrakciju je od ključnog značaja u prehrambenoj industriji jer birani uslovi imaju velik uticaj na strukturalna svojstva i tehno-funkcionalne osobine izolovanog jedinjenja a samim tim i gotovog proizvoda. Na efikasnost ekstrakcije proteina najviše utiče izbor rastvarača, odnos sirovine i rastvarača, temperatura i vreme ekstrakcije, kao i pH vrednost medijuma (Akasha, 2014).

2.5.1. Alkalna ekstrakcija

Nakon odgovarajuće selekcije biljne sirovine, kao sledeći korak od suštinskog značaja ističe se izbor odgovarajućeg metoda za ekstrakciju proteina. Alkalna ekstrakcija, kao široko rasprostranjen konvencionalan metod ekstrakcije, predstavlja jedan od najjednostavnijih i lako primenljivih postupaka koji se koriste za izolovanje proteina. Alkalni uslovi se koriste za ekstrakciju proteina iz biljnih i životinjskih izvora i/ili za modifikaciju funkcionalnih svojstava proteina. Alkalna ekstrakcija omogućava izolovanje proteina narušavanjem ćelijskog zida i razgradnjom matriksa u kojem se proteini nalaze, čineći protein rastvorljivijim u vodenom medijumu za ekstrakciju (Momen *et al.*, 2021). Generalno, ovaj konvencionalni protokol obično uključuje ekstrakciju željenog biomolekula pri alkalnom pH, taloženje ekstrahovanih proteina na izoelektričnoj tački i resolubilizaciju proteina na neutralnom pH (Deak and Johnson, 2007). Rastvorljivost proteina se povećava sa povećanjem pH rastvarača usled jonizacije kiselih i neutralnih aminokiselina na visokim vrednostima pH. Stoga, ekstrakcija proteina u alkalnoj sredini omogućava visoke prinose proteina (Kumar *et al.*, 2021).

Alkalna ekstrakcija može uticati na sekundarnu, terciarnu i kvaternarnu strukturu proteina. Kod visokog, alkalnog, pH, proteini se odvijaju usled ekstremnog odbijanja naelektrisanja u polipeptidnim lancima, a njihove hidrofobne i slobodne sulfhidrilne (-SH) grupe postaju izložene. Veća alkalnost može dovesti do većeg prinosa ekstrakcije proteina, ali njene veoma visoke vrednosti mogu biti povezane i sa povećanom denaturacijom i agregacijom proteina (Gao *et al.*, 2020). Konvencionalni alkalni proces prati i nekoliko nedostataka među kojima se prvenstveno ističe menjanje svojstava proteina tokom procesa ekstrakcije. Ove promene uključuju denaturaciju, racemizaciju i formiranje dehidro- i umreženih aminokiselina, koje posledično dovode do loše rastvorljivosti, nižeg nutritivnog kvaliteta i lošijih funkcionalnih karakteristika ekstrahovanog proteina (Friedman, 1999; Sari *et al.*, 2015).

2.5.2. Enzimima potpomognuta ekstrakcija proteina

Da bi se povećao prinos ekstrakcije proteina i očuvala njegova biološka i funkcionalna svojstva tokom samog procesa, jedno od potencijalnih rešenja predstavlja upotrebu enzima. Generalno, biljni proteini se u ćelijama nalaze u strukturama specializovanim za njihovo skladištenje (Herman and Larkins, 1999), ali i u drugim strukturama, npr. ćelijskom zidu (Jamet et al., 2006). Prisustvo različitih polisaharida kao što su hemiceluloza, celuloza i pektin u strukturi ćelijskog zida, smanjuje efikasnost ekstrakcije konvencionalnim tehnikama. Razgradnja ćelijskog zida u velikoj meri poboljšava pristup rastvarača ćelijskom sadržaju i olakšava ekstrakciju jedinjenja od značaja (Safi et al., 2015). Konkretno, upotrebom enzima koji mogu selektivno depolimerizovati i razgraditi celulozu, hemicelulozu i/ili pektin – glavne komponente zidova biljnih ćelija, povećava se prinos ekstrakcije proteina (Jung et al., 2006). Brojni literaturni navodi ističu specifične aktivnosti karbohidraza (celulaze, pektinaze, arabinanaze, β -glukanaze, ksilanaze, hemicelulaze) koje učestvuju u dezintegraciji ćelijskog zida i pomažu u oslobađanju proteina iz različitih biljnih sirovina (tabela 1).

Takođe, upotreba enzima u procesu ekstrakcije odlikuje se i manjom potrošnjom energije, većom efikasnošću i blagim procesnim uslovima. Kao još jedna od prednosti upotrebe enzimski potpomognute ekstrakcije ističe se osobina da su dobijena jedinjenja vrhunskog i očuvanog kvaliteta i, kao takva, izuzetno pogodna za ishranu ljudi (Liu et al., 2016).

Tabela 1. Enzimima potpomognute ekstrakcije proteina iz različitih biljnih sirovina

Korišćeni enzimski preparat	Biljna sirovina	Uslovi ekstrakcije	Prinos (% m/m)	Referenca
<i>Celluclast 1.5 L (Novozymes)</i>	listovi masline	pH 5, 15 min, 55 °C E: 5% (v/v)	0,2 – 0,7	<i>Vergara-Barberán et al., 2015</i>
<i>Cellulase (Gencor International)</i>	oljuštena zrna soje	pH 8, 60 min, 50 °C E: 1% (v/v)	55	<i>Lamsal et al., 2006</i>
<i>Multifect pectinase (DuPont)</i>	soja	pH 4, 3h, 50 °C E: 10% (v/v)	48	<i>Rommi et al., 2014</i>
<i>GC 140 (Enzyme Development Corp.) Finase S 40 (Novozymes)</i>	ljuspice pirinča	pH 5, 4 h, 55 °C E: 240 GXU/g + 400 PU/g	0,6	<i>Wang et al., 1999</i>
<i>Enzyme complex NS22119 (Novozymes)</i>	sojin griz	pH 5.5, 50 °C, 3 h E: 20 FPU/g	35	<i>Perović et al., 2020</i>

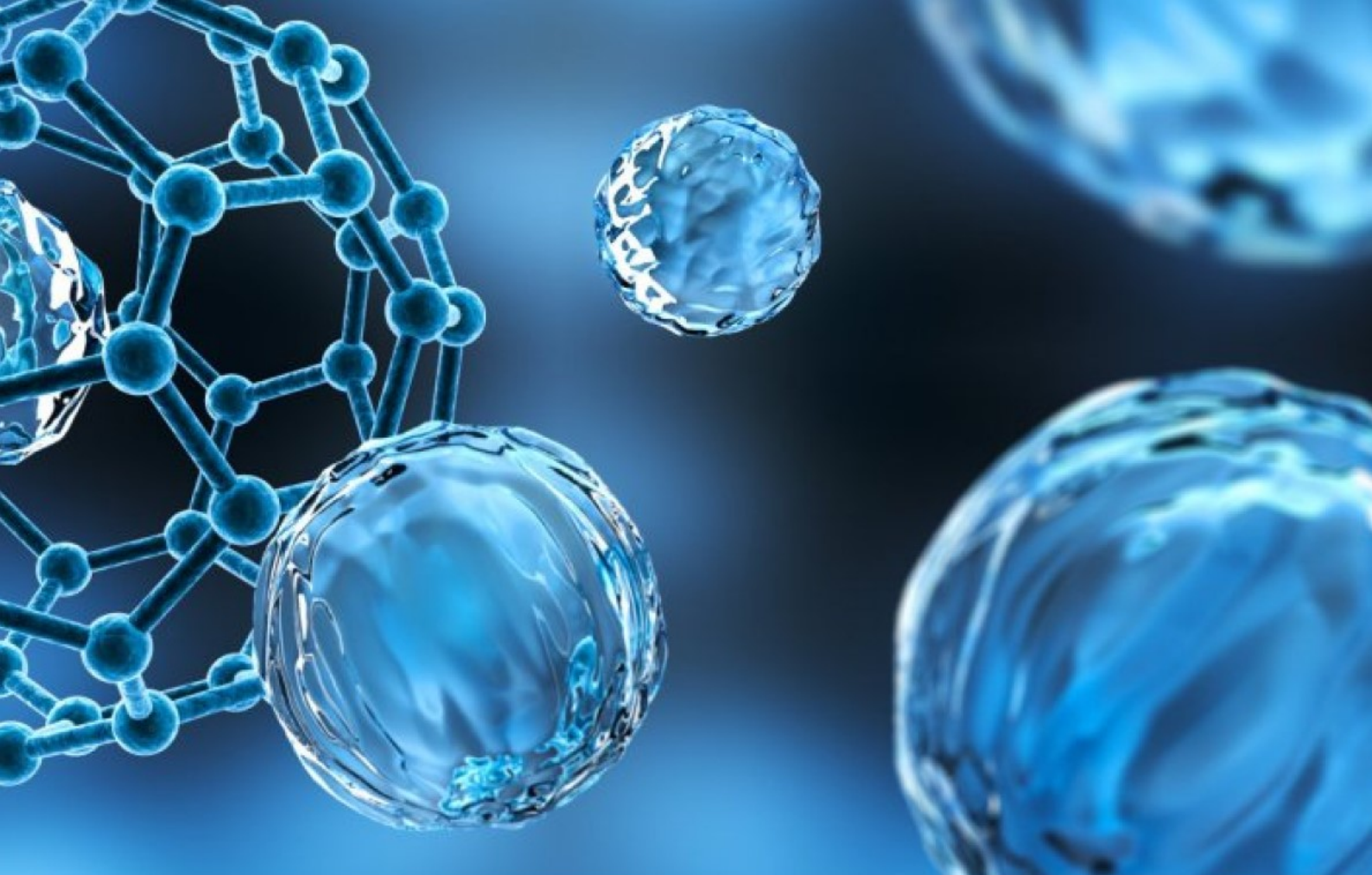
E - koncentracija enzima, FPU – jedinica celulolitičke aktivnosti, GXU - *Genencor* jedinica aktivnosti ksilanaze, PU- jedinica aktivnosti fitaze.

Upotreba enzima u prehrambenoj, farmaceutskoj i drugim industrijama odavno je poznata po svojoj efikasnosti, kako u tehnološkom, tako i u ekonomskom smislu. Obuhvata postizanje visokih prinosa proizvoda, smanjenje formiranja nusproizvoda i kompleksa između oslobođenih proteina i različitih ćelijskih komponenata, kao i prevazilaženje nekih uslova pod kojima se odvijaju tehnološki procesi a koji mogu biti štetni po ljude i okolinu (*Marathe et al.*, 2017). Zato se može reći da je primena enzima u protokolima za ekstrakciju biomolekula ekološki prihvatljiva tzv. „zelená” tehnika ekstrakcije kojom se, osim povećanja prinosa, prevazilaze prethodno navedeni nedostaci alkalne ekstrakcije (*Nadar et al.*, 2018).

Različita istraživanja su za temu imala upotrebu enzima u postupku ekstrakcije proteina iz mahunarki. Tako je ekstrakcija potpomognuta glukoamilazom, korišćena na laboratorijskom i pilot nivou, pokazala značajno poboljšanje brzine ekstrakcije i funkcionalnih svojstava proteina ekstrahovanog iz sočiva, uz postignut prinos od 50% (*Bildstein et al.*, 2008). Poboljšanje prinosa od 17% do 50% zabeleženo je tokom ekstrakcije proteina iz soje nakon tretmana komercijalnom pektinazom, u poređenju sa ekstrakcijom bez enzima (*Jung et al.*, 2006). Takođe, kada je primenjena alkalna ekstrakcija proteina is soje, ostvaren je prinos od 33%, dok je tretman pektinazom doveo do poboljšanja prinosa, koji je povećan na 56% (*Rosset et al.*, 2012). Tretman sojinog griza celulazom omogućio je prinos proteina od 27% (računato na suhu materiju sirovine) što je predstavljalo povećanje od 70% u odnosu na ekstrakciju vodom bez enzima (*Perović et al.*, 2020). Različiti literaturni podaci takođe potvrđuju efikasnost upotebe enzima tokom izdvajanja proteina iz pasulja, lana, ječma i lišća masline, što predstavlja obećavajuću alternativu konvencionalnom načinu ekstrakcije (*Bildstein et al.*, 2008; *Houde et al.*, 2018; *Tirgar et al.*, 2017; *Vergara-Barberán et al.*, 2015).

Treba reći da su osim karbohidraza, i proteolitički enzimi korišćeni za pretretman biljnih sirovina, te da su pokazali pozitivan efekt na povećanje brzine ekstrakcije, kao i rastvorljivosti proteina iz uljane repice, soje i pasulja, uz njihovu istovremenu hidrolizu (*Liu et al.*, 2011; *Sari et al.*, 2013).

Prednosti primene enzima za tretman biljnih sirovina u cilju poboljšanog izdvajanja proteina još uvek nisu u potpunosti iskorišćene, pa su enzimima potpomognute ekstrakcije predmet kontinuiranog istraživanja, a s obzirom na sve prednosti koje donose, imaju potencijal da budu komercijalno prihvaćene (*Puri et al.*, 2012). Ovo se posebno odnosi na enzimima potpomognutu ekstrakciju mahunarki, imajući u vidu važnost proteina iz ovih izvora, jer bi se na taj način ustanovila efikasna i ekološki prihvatljiva tehnologija.



NANOBIOTEHNOLOGIJA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI



2.6. Nanobiotehnologija u prehrambenoj industriji

Na isti način na koji je prefiks „mikro“ ušao u široku upotrebu tokom 1980-ih, prefiks „nano“ je koncipiran da opiše trenutni razvoj tehnologija koje se baziraju na smanjenju dimenzija materijala i ispitivanju njihove potencionalne primene. Reč „nano“ vodi poreklo od grčke reči „νάνος“ što znači patuljak. Nanočestice su opšte prihvaćene kao one koje imaju veličinu od 1 do 100 nm, i čiji jedinstveni fenomeni i karakteristike omogućavaju brojne prednosti i nove primene u različitim sferama industrije (*Sekhon, 2010*).

Nanotehnologija omogućava formiranje raznovrsnog spektra novih struktura i sistema koji mogu biti nanočestice, nanodisperzije, nanokapsule, nanocevi, nanosfere, kvantne tačke itd. Modifikacija i izrada materijala na nano nivou stvara čestice malih veličina sa veoma velikim odnosom površine prema zapremini. Upravo ova karakteristika dovodi do poboljšanih optičkih, električnih, mehaničkih i funkcionalnih karakteristika materije i odgovorna je za uspešnu sadašnju ali, po svemu sudeći, i buduću primenu ove nove tehnologije (*Naseer et al., 2018*). Pri tome, veličina nanočestica i raspodela veličina, hemijski sastav i sposobnost interakcija predstavljaju osnovne faktore koji regulišu jedinstvena svojstva nanomaterijala.

Nanobiotehnologija je multidisciplinarna tehnološka i naučna oblast koja se u poslednje vreme veoma brzo razvija. Povezanost nanotehnologije sa drugim naukama i tehnologijama, uključujući biotehnologiju, hemiju, fiziku i inženjerstvo, izazvala je revoluciju u nekoliko sektora nauke i tehnologije, koja se, pre svega, ogleda u razvoju brojnih novih materijala i otvaranju širokog spektra njihove primene. Razloge za to treba tražiti u činjenici da upotreba nanomaterijala doprinosi poboljšanju proizvodnih procesa i dobijanju proizvoda sa unapređenim karakteristikama ili novim funkcionalnostima. Zbog ogromnog potencijala nanotehnologije, mnoge kompanije širom sveta ulažu velika sredstva u ovaj sektor (*McIntyre, 2012*).

I tržište hrane zahteva nove tehnologije, koje su neophodne za održavanje liderstva u prehrambenoj industriji u pogledu proizvodnje svežih, autentičnih, ukusnih i zdravstveno bezbednih prehrambenih proizvoda (*Lindgren et al., 2018; Samal, 2017*). Ministarstvo poljoprivrede Sjedinjenih Američkih Država (USDA) je 2003. godine kao prvo objavilo Zakon o istraživanju i razvoju nanotehnologije 21. veka (R&D) za primenu nanomaterijala u poljoprivredi i prehrambenoj industriji. Razni korisni efekti primene nanotehnologije doveli su do povećanja ulaganja prehrambene industrije u nanotehnologiju, povećavajući tržište „nanohrane“ sa 6,5 milijardi USD u 2013. na očekivanih 20 milijardi USD u 2020. (*Rai and Bai, 2017*). U tom smislu, predviđa se da će nanotehnologija transformisati kompletnu prehrambenu industriju, menjajući načine na koje će se hrana proizvoditi, obrađivati, pakovati i transportovati.

Uvođenje nanobiotehnologije u proizvodnju hrane podrazumeva prolazak hrane kroz niz modifikacija koje će verovatno uticati na njene biohemijske karakteristike. U isto vreme, koncepti na kojima se zasniva primena nanotehnologije u proizvodnji hrane pružaju dobar okvir za bolje razumevanje interakcija i organizaciju njenih sastavnih komponenata u nanostrukture. Ove strukture, naime, imaju velik uticaj na strukturu same hrane, reologiju i funkcionalna svojstva proizvedenog prehrambenog proizvoda. S obzirom na veliki uticaj sastava na njihovu sudbinu u gastrointestinalnom traktu (GIT), kao i potencijalnu toksičnost, nanočestice prisutne u hrani mogu se kategorisati na (*McClements and Xiao, 2017*):

- neorganske nanočestice i
- organske nanočestice.

Neorganske nanočestice koje se koriste u prehrambenim sistemima uglavnom se sastoje od neorganskih materijala kao što su srebro, silicijum-dioksid, gvožđe-oksidi, titanijum-dioksid i cink-oksidi (Pietrojusti et al., 2016). Ove čestice mogu biti sferičnog ili nesferičnog oblika sa različitim površinskim karakteristikama i veličinama u zavisnosti od materijala i uslova pripreme. Takve neorganske nanočestice imaju različite tendencije da se rastvaraju pod specifičnim uslovima rastvora (pH i jonska jačina), kao i da ispoljavaju različitu hemijsku reaktivnost, što ima veliki uticaj na njihovu gastrointestinalnu sudbinu i toksičnost.

Organske nanočestice su u osnovi sastavljene od organskih supstanci, poput ugljenih hidrata, proteina i/ili lipida. Ove supstance su tečne, polučvrste ili čvrste materije (kristalne ili amorfne) na sobnoj temperaturi, što zavisi od njihovog sastava i načina pripreme. Korišćenje nekovalentnih (slabih) interakcija za samoorganizaciju, kao i metoda za dobijanje čestica kontrolisanih veličina omogućavaju da se organski materijali transformišu u željene strukture poput micela, lipozoma i polimernih nanočestica (Jeevanandam et al., 2018). Organske nanočestice se obično inkorporiraju u hranu kako bi se obezbedile željene optičke, teksturalne ili nutritivne karakteristike gotovih proizvoda (Pan and Zhong, 2016). Uopšteno govoreći, smatra se da su organske nanočestice manje toksične od neorganskih, jer su često potpuno svarljive u ljudskom GIT-u. Upravo iz ovog razloga, naučnici su obično više fokusirani na njihovu proizvodnju i upotrebu u prehrambenoj nanoindustriji (McClements et al., 2017).

2.6.1. Proteini kao nanostrukture za unapređenu primenu

Među različitim nanostrukturama na bazi prirodnih ili sintetičkih polimera koji su potencijalno dostupni prehrambenoj industriji, nanočestice zasnovane na proteinima izazivaju veliku pažnju zbog brojnih prednosti u odnosu na ostale. U prvom redu, proteini predstavljaju grupu biomolekula koji pokazuju jedinstvene osobine i funkcionalnosti koje ih čine veoma primenljivim kako sa biološkog i nutritivnog aspekta, tako i sa aspekta njihovih svojstava kao materijala. Nadalje, ovi biomolekuli su pogodna alternativa sintetičkim polimerima koji se najčešće koriste u formulaciji nanočestica, prvenstveno zbog svoje bezbednosti. Takođe, proteini poseduju GRAS (*Generally Recognized as Safe*) status što najviše doprinosi njihovoj širokoj primeni. Proteini su relativno jeftini, jednostavni su za obradu i dobijaju se iz obnovljivih i održivih izvora (Martínez-López et al., 2020). I konačno, sa aspekta pripreme, proteinske nanočestice se relativno lako dobijaju a njihova veličina se može pratiti i kontrolisati variranjem procesnih uslova (De Frates et al., 2018).

Sa opšte tačke gledišta, dakle, upotreba proteina kao strukturnih materijala za proizvodnju nanočestica nudi niz važnih prednosti. Nanočestice na bazi proteina su netoksične, biorazgradive, lako se metabolišu i poseduju dobru biokompatibilnost. Pored toga, otkriveno je da izazivaju slab ili zanemarljiv imuni odgovor. Amfifilna priroda proteina pomaže im u interakciji kako sa hidrofiličnim, tako i sa hidrofobnim jedinjenjima i rastvaračima. Njihove nanometarske veličine, definisanost strukture, kao i prisustvo velikog broja funkcionalnih grupa dostupnih za brojne modifikacije čine ih atraktivnim za upotrebu u prehrambenoj industriji (Jain et al., 2018).

Nanočestice na bazi proteina mogu se dobiti relativno jednostavnim postupcima (prvenstveno zbog definisane primarne strukture proteina), pod blagim uslovima i bez upotrebe toksičnih hemikalija ili organskih rastvarača. Brojne modifikacije površine proteina otvaraju širok spektar

moгуćnosti formiraja kompleksa sa polisaharidima, lipidima ili drugim biopolimerima, čime se poboljšava inkorporacija različitih bioaktivnih jedinjenja na relativno nespecifične načine. Ova osobina proteina čini ih superiornijim u odnosu na druge materijale. Nanočestice zasnovane na proteinima takođe mogu stvarati konjugate sa bioaktivnim materijama preko primarnih amino ili sulfhidrilnih grupa (*Chen et al.*, 2006).

2.6.2. Mehanizmi stvaranja proteinskih nanočestica

Intenzivno istraživanje i razvoj u oblasti nanotehnologije svakako su doprineli i razvoju različitih strategija i metoda za proizvodnju proteinskih nanočestica. Brojni metodi, koji uključuju isoljavanje (*salting out*), emulgovanje, koacervaciju, stvaranje kompleksa sa polielektrolitima, termički tretman i *spray drying* tehniku, uspešno se koriste za proizvodnju nanočestica na bazi proteina. Veličina proteinskih nanočestica proizvedenih korišćenjem ovih metoda obično se kreće od 100 do 1000 nm. Kontrola i optimizacija konačne veličine nanočestica, odnosno prečnika nanočestica je ključni uslov za uspeh procesa i dobijanje nanočestica željenih karakteristika (*Jain et al.*, 2018).

Termički tretman kao metod za dobijanje proteinskih nanočestica koristi uticaj povišene temperature na proteinske molekule. Naime, termički tretman podrazumeva zagrevanje proteina na ili iznad temperature njihove denaturacije. Zagrevanje podstiče odvijanje strukture proteina, fenomen poznat kao denaturacija, zbog koje dolazi do veće izloženosti hidrofobnih aminokiselina na površini, sada, denaturisanog proteina, a što, kao posledicu, ima povećanje njegove površinske hidrofobnosti (*Sponton et al.*, 2015a). Izložene hidrofobne grupe stupaju u interakciju formirajući agregate različitih dimenzija preko ostvarenih hidrofobnih veza.

Kratak termički tretman (15 min) delimično otvara terciarnu strukturu molekula proteina, što rezultira monodisperzinom formulacijom sa manjom veličinom nanočestica. Termička obrada tokom dužeg vremena i na višim temperaturama dovodi do potpunog otvaranja strukture molekula proteina, koji zatim agregiraju (*Pascoli et al.*, 2018). Ovaj fenomen je uobičajeno vođen intermolekulskim interakcijama koje se javljaju između izloženih hidrofobnih aminokiselina ali i formiranjem disulfidnih veza (*Liu et al.*, 2017; *Zhou et al.*, 2017). Štaviše, pod određenim uslovima jonske jačine i pH vrednosti, zagrejane proteinske disperzije mogu proizvesti proteinske agregate različitih veličina i morfologija.

S obzirom da termički tretman promovise veliku ekspoziciju hidrofobnih ostataka na površini proteina, površinske karakteristike ovakvih proteinskih agregata su izuzetno važne za vezivanje različitih bioaktivnih jedinjenja. Kao što je poznato, jedna od strategija za poboljšanje kapaciteta vezivanja proteina prema različitim biomolekulima se sastoji u podvrgavanju rastvora proteina termičkom tretmanu u kontrolisanim uslovima (*Sponton et al.*, 2017). Dalje unapređenje proteinskih nanostrukture sa odgovarajućom površinskom hidrofobnošću, sposobnih da vežu druge biomolekule, može se voditi tako da se poboljša njihova stabilnost ali i da se poveća njihova rastvorljivost, i tako omogućiti ugrađivanje u različite prehrambene sisteme (*Sponton et al.*, 2015a).

Različita istraživanja su potvrdila mogućnost primene termičkog tretmana za pripremu nanočestica iz biljnih proteina. *Liu and Tang* (2013) su pokazali da je termički tretman sojinih proteina na 95 °C u trajanju od 15 minuta doveo do stvaranja proteinskih nanočestica veoma malih dimenzija (~60 nm). Nanočestice proteina kikirikija pripremljene su takođe uz pomoć termičkog tretmana (100 °C, 120 min) (*Ning et al.*, 2020). *Hall and Moraru* (2021) su koristili termički tretman

od 95 °C u trajanju od 15 minuta za pripremu nanočestica iz proteina graška. Kada je proteinski izolat pasulja bio podvrgnut termičkom tretmanu (85 °C, 60 min), termalna agregacija je dovela do stvaranja nanočestica dimenzija <100 nm (Zhang *et al.*, 2010). Dokazano je da termički tretman nativnih biljnih proteina dovodi do specifičnih konformacionih promena i stvaranja nanostrukture (Abdelsalam *et al.*, 2021).

Pored termičkog tretmana, za pripremu proteinskih nanočestica koriste se i druge tehnike kao što su emulgovanje, desolvatacija, sušenje raspršivanjem, homogenizacija pod visokim pritiskom, elektroraspršivanje, od kojih svaka od njih ima svoje prednosti i nedostatke (De Frates *et al.*, 2018; Verma *et al.*, 2018).

Emulgovanje. Kod tehnike emulgovanja, najjednostavnije rečeno, rastvor polimera ili vodeni rastvor proteina u vodenom/organskom rastvaraču (W) se dodaje u neku uljanu fazu (O) u kojoj se protein ne rastvara, kako bi se formirao sistem emulzije (W/O) u uslovima mehaničkog mešanja ili sonikacije. Zatim se vrši uklanjanje rastvarača/nerastvorne faze i prečišćavanje u cilju dobijanja stvorenih nanočestica. Ovi sistemi se smatraju kinetički stabilnim i mogu rezultirati novim nanostrukturama sa unapređenim funkcionalnim i reološkim svojstvima, poželjnim za prehrambenu industriju. Koncentracija proteina i odnos zapremina vodene i uljne faze (W:O) tokom emulgovanja su kritični parametri u proizvodnji proteinskih nanočestica ovim metodom (Jain *et al.*, 2018). Kada je reč o nanočesticama pripremljenim od proteina mahunarki, one su uspešno fabrikovane iz proteina soje i graška metodom emulgovanja i korišćene za enkapsulaciju likopena (Ho *et al.*, 2017).

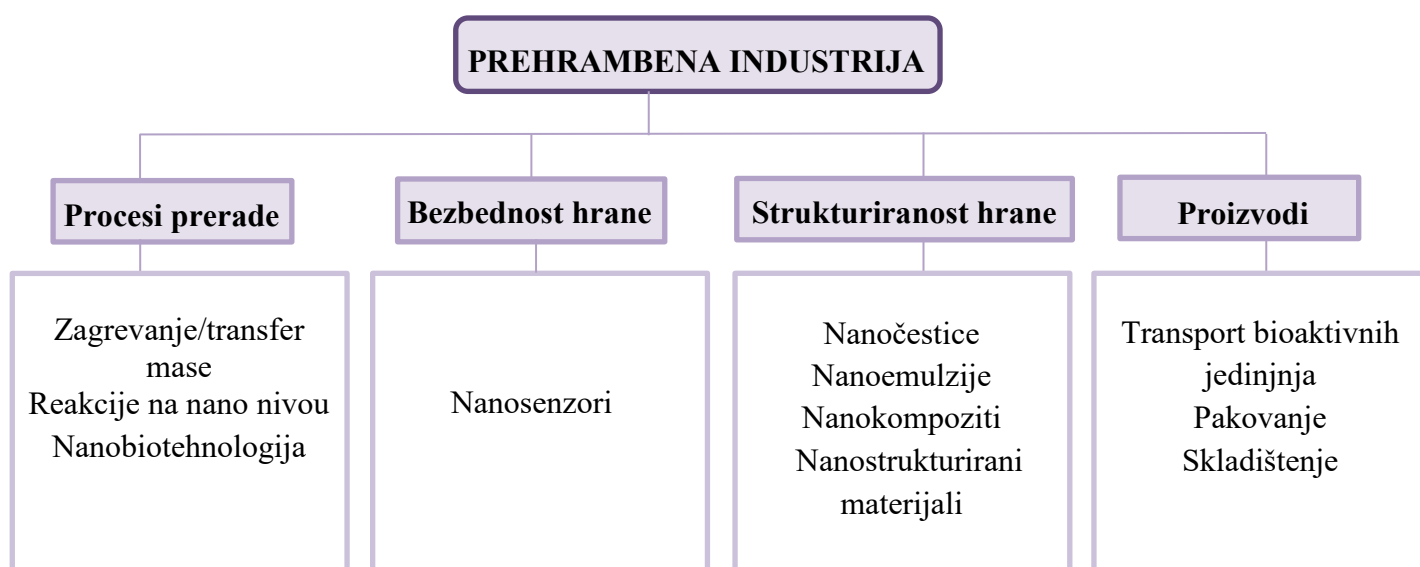
Desolvatacija. Proces desolvatacije je metod izbora za proizvodnju proteinskih nanočestica, prvenstveno zbog svoje jednostavnosti i prednosti koja se ogleda u dobijanju nanočestica manjih veličina. Princip ovog metoda predstavlja smanjenje rastvorljivosti proteina prisutnog u vodenom rastvoru korišćenjem agenasa za desolvatovataciju kao što su alkoholi, ketoni i različite soli, što dovodi do razdvajanja faza. Dodavanje agensa za desolvataciju ima tendenciju da promeni konformaciju proteina i smanji njegovu rastvorljivost, što dovodi do precipitacije u obliku proteinskih nanoprecipitata. Ovakav proces je jedan od široko primenjivanih metoda koji se koriste za pripremu proteinskih nanočestica (Jain *et al.*, 2018). Teng *et al.* (2012) su koristili metod desolvatacije pri proizvodnji nanočestica iz proteina soje, koje su se kasnije koristile kao nanonosaci pri inkapsulaciji različitih bioaktivnih jedinjenja.

2.6.3. Unapređena primena proteinskih nanočestica

Imajući u vidu porast svetske populacije, aktuelne ekološke i klimatske probleme, nedostatak izvora energije i smanjenje obradivih površina, upotreba savremenih tehnologija koje se baziraju na poboljšanju proizvodnje hrane i unapređenju njenog kvaliteta dobija sve veći značaj. Istraživanja u polju nanotehnologije poseduju izuzetno visok potencijal za ostvarenje brojnih pogodnosti koje mogu koristiti društvu, s posebnim naglaskom na primenu u prehrambenoj industriji. Termin „nanohrana“ opisuje hranu koja je proizvedena, obrađena ili upakovana korišćenjem nanotehnoloških tehnika ili alata, ili u koju su dodati proizvedeni nanomaterijali (Joseph and Morrison, 2006). Upotrebe nanotehnologije u najzastupljenijim sferama prehrambene industrije prikazane su na slici 4.

Primena nanotehnologije u prehrambenoj industriji donosi brojne prednosti koje se prvenstveno ogledaju u povećanoj bezbednosti, biodostupnosti, unapređenju nutritivnih i senzornih svojstava, povećanju funkcionalnosti, produžetaku roka trajanja, kao i smanjenju troškova prilikom

skladištenja gotovih proizvoda (Zahra et al., 2022). Izrazita funkcionalna i nova svojstva materijala za pakovanje postignuta su uključivanjem nanočestica različitih fizičkih i hemijskih karakteristika. Nanočestice pripremljene na bazi polisaharida, proteina i lipida umnogome pomažu da se očuva i produži rok trajanja različitih prehrambenih proizvoda. Takođe, ovako pripremljene nanočestice mogu se koristiti za inkapsuliranje različitih hidrofилnih, amfifilnih ili lipofilnih supstanci i aktivnih funkcionalnih agenasa kao što su antimikrobni agensi, agensi koji sprečavaju promenu boje proizvoda, i antioksidanti. Ovakva upotreba nanotehnologije ima mogućnost da poveća rok trajanja i kvalitet proizvedene hrane i to najčešće mesa, sira, voća i povrća, konditorskih i pekarskih proizvoda i brze hrane (Weiss et al., 2006).



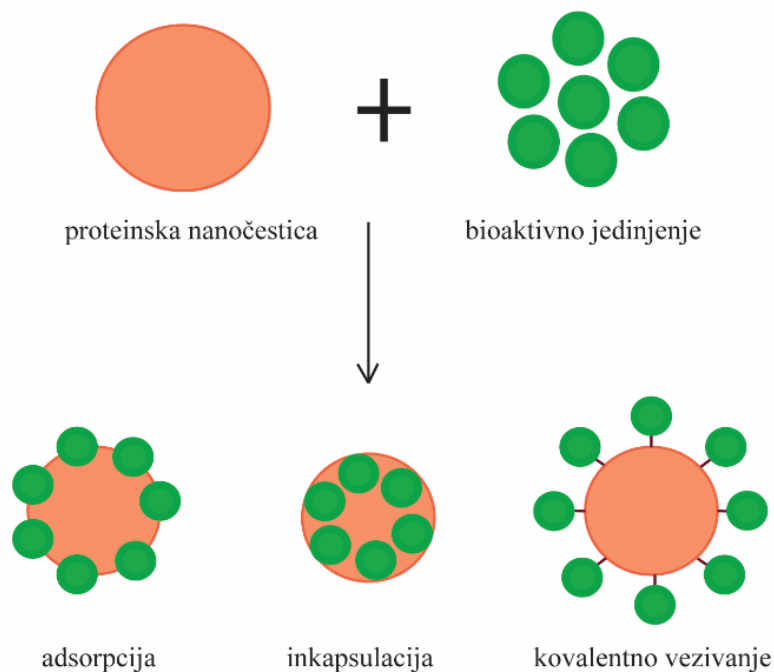
Slika 4. Nanotehnologija u prehrambenoj industriji (Jahanshahi and Mehravar, 2009)

Nanočestice, pored toga, pokazuju veliki potencijal za poboljšanje biodostupnosti različitih bioaktivnih jedinjenja koja se široko koriste kao aktivni sastojci u raznim prehrambenim proizvodima (Chen et al., 2006). Pored dimenzije, kao najvažnije karakteristike koja ih čini posebnim u poređenju sa drugim sistemima za vezivanje i isporuku bioaktivnih jedinjenja, interakcija nanočestica sa različitim biološkim molekulima igra glavnu ulogu u njihovom funkcionisanju kao nosača.

Proteinske nanočestice imaju sposobnost da vezuju različite bioaktivne supstance specifičnim ili nespecifičnim interakcijama, ili da formiraju komplekse s drugim molekulima, što ih čini pogodnim agensima za transport tih komponenata (slika 5). Poznato je da denaturacija proteina pod određenim uslovima (termički tretman, izolovanje, itd.) dovodi do povećanja njihove hidrofobnosti i stvaranja mesta za vezivanje različitih hidrofobnih bioaktivnih komponenti. Tako su, na primer, proteinske nanočestice dobijene termičkim tretmanom β -laktoglobulina iz mleka i ovalbumina iz belanceta pokazale povećan kapacitet vezivanja linolne kiseline (Fang et al., 2015; Perez et al., 2015; Sponton et al., 2015b).

Poslednjih nekoliko decenija, naučnici su ispitivali potencijal transporta različitih bioaktivnih jedinjenja uz pomoć nanočestica pripremljenih od proteina iz različitih izvora (tabela 2). Tokom

pripreme nanočestica, veoma je bitno kontrolisati njihovu veličinu, površinu i druge karakteristike, jer od toga zavisi s kakvim rezultatom će ispuniti zadatak, odnosno oslobaditi aktivna jedinjenja sa ciljem postizanja specifičnog i/ili ciljanog delovanja (Hong *et al.*, 2020).



Slika 5. Načini interakcije bioaktivnih jedinjenja i nanočestica (Sripriyalakshmi *et al.*, 2014)

Generalno, nanonosai moraju imati određene karakteristike u koje spadaju:

- netoksičnost, efikasnost i sigurnost pri upotrebi *in vivo*,
- prihvatljiv rok trajanja,
- visok zeta potencijal za sprečavanje agregacije nanočestica,
- kontrolisana degradacija u cilju sprečavanja neodgovarajućeg oslobađanja vezane bioaktivne komponente,
- proizvodi razgradnje nanonosai treba da budu netoksični, da se lako metabolišu i izbacuju iz tela i
- jednostavnost i isplativa proizvodnja (Jain *et al.*, 2018).

Očigledno je da se proteini iz različitih izvora mogu koristiti za dobijanje nanočestica i to korišćenjem relativno jednostavnih, ekonomičnih i ekološki prihvatljivih postupaka sa manjom upotrebom toksičnih hemikalija. Brojna istraživanja se sprovode u cilju razvijanja i unapređenja nanobiotehnologije zasnovane na proteinskim nanočesticama (Tarhini *et al.*, 2017). Ova istraživanja se pokazuju kao veoma bitna i omogućavaju još veću ekspanziju nanobiotehnologije i njenu

praktičnu primenu u brojnim prehrambenim sistemima, kao i u sistemima za distribuciju brojnih bioaktivnih jedinjenja od značaja.

Tabela 2. Nanonosaići od proteina iz različitih izvora korišćeni za transport bioaktivnih jedinjenja

Bioaktivno jedinjenje	Izvor proteina	Metod	Poboljšanje	Referenca
β -karoten	grašak	emulgovanje	produženo oslobađanje β -karotena	Shao and Tang, 2016
vitamin C	soja	sušenje raspršivanjem	povećana efikasnost mikroinkapsulacije	Nesterenko et al., 2014
vitamin D ₃		emulgovanje	stabilnost preko 30 dana skladištenja	Ferreira et al., 2022
folna kiselina	leblebija	liofilizacija	veća stabilnost	Ariyaratna and Nedra Karunaratne, 2015
polifenoli	kukuruz	elektroaspršivanje	povećana <i>in vitro</i> gastrointestinalna stabilnost i permeabilnost	Bhushani et al., 2017
različita lipofilna jedinjenja	ječam	emulgovanje	veća stabilnost tokom skladištenja i u gastrointestinalnom traktu	Wang et al., 2011
		homogenizacija pod visokim pritiskom	bolja zaštita bioaktivnih jedinjenja i stabilnost tokom skladištenja	Yang et al., 2014
kurkumin	orah	elektroaspršivanje	povećana antioksidativna aktivnost	Asadi et al., 2021
kurkumin	pirinač	termički tretman	veća stabilnost i rastvorljivost	Peng et al., 2017
kurkumin	suncokret	desolvatacija	povećana stabilnost	Mehryar et al., 2021
kvercetin	pšenica	emulgovanje	poboljšana rastvorljivost i biodostupnosti	Chen et al., 2018
astaksantin	krompir	desolvatacija	povećana biodostupnost	Edelman et al., 2019

3. Materijal i metodi

3.1. Sirovina

Seme leblebije (*Cicer arietinum* L.) je predstavljalo polaznu sirovinu za pripremu proteinskih izolata i frakcija. Seme leblebije vrste Kabuli je kupljeno u lokalnoj specijalizovanoj prodavnici. Do početka eksperimentalnog dela, seme leblebije čuvano je u frižideru na temperaturi od 4 °C.

Na samom početku eksperimentalnog rada, seme leblebije je očišćeno od nečistoća, samleveno u električnom mlinu i prosejano kroz sito sa prečnikom otvora od 1 mm. U cilju uklanjanja masnih materija iz ovako pripremljene sirovine, izvršena je ekstrakcija etanolom i to pod sledećim uslovima - smeša samlevena leblebija:etanol = 1:5 (m/v) je mešana na sobnoj temperaturi 2 sata, i još jednom ponovljena pod istim uslovima. Nakon završetka ekstrakcije, čvrsta faza je odvojena centrifugiranjem na 3000×g tokom 15 min na 4 °C (Sorval RC-5B, Dupont Instruments). Da bi se uklonio sav zaostali etanol, tretirana leblebija je sušena na 40 °C u trajanju od 36 h. Ovako pripremljen materijal je korišćen u daljim eksperimentima.

3.2. Hemijski sastav sirovine

Hemijska karakterizacija materijala podrazumevala je određivanje sadržaja masti, proteina, ukupnih, rastvorljivih i nerastvorljivih vlakana, skroba i pepela. Sadržaj masti (pre procesa obezmašćivanja) određen je metodom po *Weibull-Stoldt*-u (*Stoldt*, 1949). Ostali metodi su primenjeni u cilju ispitivanja hemijskog sastava obezmašćene sirovine. Set za ispitivanje ukupnih prehrambenih vlakana (*Total Dietary Fiber Assay Kit K-TDFR, Megazyme*) je korišćen za ispitivanje ukupnih (TDF), nerastvorljivih (IDF) i rastvorljivih (SDF) dijetetskih vlakana (AACC 32-05.1). Sadržaj proteina određen je metodom po *Kjeldahl*-u (AOAC 991.20). Sadržaj pepela određen je gravimetrijskim metodom, sušenjem na 550 °C do konstantne mase. Sadržaj skroba određen je pomoću komercijalnog kompleta za određivanje ukupnog skroba (*Total starch kit K-TSTA, Megazyme*) (AACC 76-13-01).

3.3. Enzimski preparati i njihove aktivnosti

Za enzimski pretretman obezmašćene leblebije korišćeni su sledeći enzimi: α -L-arabinofuranozidaza (α -L-*Arabinofuranozidase, Megazyme*), endo-ksilanaza (NS22083, *Novozymes*), koktel pektinaza (*Vinozym, Novozymes*), kompleks celulaza (*Cellulase complex, NS22086, Novozymes*) i koktel enzima Enzim kompleks (*Enzyme complex, NS22119, Novozymes*).

Aktivnost enzimskog preparata α -L-*Arabinofuranozidase* iznosila je 300 U/ml i određena je prema *McCleary et al.* (2015). Jedinica aktivnosti α -L-arabinofuranozidaze (U) je definisana kao količina enzima potrebna za oslobađanje jednog μ mola *p*-nitrofenola u minuti iz *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranozida pod definisanim uslovima (temperatura 40 °C, pH 4).

Celulolitička aktivnost preparata *Cellulase complex* i *Enzyme complex* iznosila je 340 FPU/ml i 30 FPU/ml, redom, i određena je metodom po *Ghose*-u (1987). Jedna FPU jedinica je definisana kao količina enzima potrebna za oslobađanje 2 mg redukujućih šećera iz 50 mg *Whatman* br.1 filter papira za 1 h pod standardnim uslovima hidrolize (temperatura 50 °C, pH 4,8).

Ksilanazna aktivnost enzimskih preparata NS22083 i *Enzyme complex* analizirana je prema metodi *Bailey et al.* (1992) i utvrđeno je da iznosi 375 U/ml i 6 U/ml, redom. Jedna jedinica aktivnosti ksilanaze (U) definisana je kao količina enzima koja oslobađa 1 mmol ksiloze po minuti pod definisanim uslovima (temperatura 50 °C, pH 5,3).

Pektinolitička aktivnost enzimskih preparata *Vinozym* i *Enzyme complex* analizirana je prema metodu *Patil and Dayanand* (2006) i iznosila je na 7,8 U/ml i 1,1 U/ml, redom. Jedna jedinica aktivnosti pektinaze (U) definisana je kao količina enzima koja katalizuje oslobađanje 1 mmol galakturonske kiseline u minuti u definisanim uslovima (temperatura 45 °C, pH 4,5).

3.4. Priprema proteinskih izolata

Proteinski izolati pripremljeni su nakon alkalne i enzimima potpomognutih alkalnih ekstrakcija obezmašćene leblebije, posle čega je usledila izoelektrična precipitacija proteina i njihovo sušenje.

3.4.1. Alkalna ekstrakcija

Preliminarno ispitivanje trajanja alkalne ekstrakcije je izvedeno na pH 10,5 i 50 °C sa odnosom čvrsta materija:tečnost = 1:10 (m/v), uz konstantno mešanje tokom 1 h i 2 h. U svim narednim eksperimentima alkalna ekstrakcija (ALK) je izvođena u trajanju od jednog sata, pod gore navedenim uslovima pH, temperature i odnosa čvrsto:tečno.

3.4.2. Testiranje enzima za pretretman leblebije

Različiti enzimi za hidrolizu polisaharida ćelijskog zida biljaka – celulaze, pektinaze, ksilanaze i arabinofuranozidaza (primenjenih pojedinačno ili u kombinaciji), kao i komercijalni enzimski koktel testirani su za tretman leblebije pre alkalne ekstrakcije. Ekstrakcije su izvedene pod definisanim uslovima pH i temperature, pri odnosu čvrsta materija:tečnost = 1:10 (m/v). Uslovi ekstrakcija, kao i doze korišćenih enzima prikazani su u tabeli 3.

Kontrola (K) je sprovedena pod istim uslovima kao i enzimske ekstrakcije, s tim da je deo koji je odgovarao enzimskom tretmanu izveden bez enzima (vodena ekstrakcija 30 min, pH 5,5, 50 °C) praćena alkalnom ekstrakcijom (1 h, pH 10,5, 50 °C).

Nakon ekstrakcije, suspenzije su centrifugirane na 9000×g tokom 15 minuta na 4 °C. Koncentracija ekstrahovanih proteina u supernatantima određena je metodom po Bradfordu (*Bradford*, 1976) sa BSA kao standardom.

3.4.3. Enzimima potpomognuta alkalna ekstrakcija u pripremi izolata

U enzimima potpomognutim ekstrakcijama za dobijanje odgovarajućih proteinskih izolata, obezmašćena leblebija je, pre alkalne ekstrakcije, tretirana individualnom arabinofuranozidazom, kao i kombinacijom celulaza i ksilanaze. Obezmašćena leblebija suspendovana je u destilovanoj vodi u odnosu 1:10 (m/v), uz podešavanje pH vrednosti na 5,5 sa 0,5 mol/l HCl. Zatim je u ekstrakciji potpomognutoj arabinofuranozidazom dodato 0,06 U arabinofuranozidaze/g_{SM}, dok je u ekstrakciji uz pomoć ksilanaze i celulaza dodato 34 U ksilanaze kombinovane sa 17 FPU celulaze/g_{SM}, i suspenzije su termostatisirane na 50 °C tokom 30 min. Nakon isteka definisanog vremena enzimskog tretmana, pH je podešen na 10,5 i alkalna ekstrakcija je nastavljena tokom 1 h na 50 °C.

Tabela 3 Enzimi i uslovi tretmana za potpomognutu alkalnu ekstrakciju leblebije

Ekstrakcija	Oznaka	Doza enzima/g _{SM}	Uslovi
celulaze + alkalna ekstrakcija	C	17 FPU	tretman celulazama (30 min, pH 5,5, 50 °C) + alkalna ekstrakcija (1 h, pH 10,5, 50 °C)
ksilanaza + alkalna ekstrakcija	X	34 U	tretman ksilanazom (30 min, pH 5,5, 50 °C) + alkalna ekstrakcija (1 h, pH 10,5, 50 °C)
pektinaze + alkalna ekstrakcija	P	0,4 U	tretman pektinazama (30 min, pH 5,5, 50 °C) + alkalna ekstrakcija (1 h, pH 10,5, 50 °C)
arabinofuranozidaza + alkalna ekstrakcija	ARA	0,06 U	tretman arabinofuranozidazom (30 min, pH 5,5, 50 °C) + alkalna ekstrakcija (1 h, pH 10,5, 50 °C)
Enzim kompleks + alkalna ekstrakcija	EC	17 FPU + 3 U (ksilanaza) + 0,5 U (pektinaze)	tretman Enzimskim kompleksom (30 min, pH 5,5, 50 °C) + alkalna ekstrakcija (1 h, pH 10,5, 50 °C)
(ksilanaza+celulaze) + alkalna ekstrakcija	X+C	34 U (ksilanaza) + 17 FPU (celulaze)	tretman kombinacijom ksilanaze i celulaza (30 min, pH 5,5, 50 °C) + alkalna ekstrakcija (1 h, pH 10,5, 50 °C)
(ksilanaza+pektinaze) + alkalna ekstrakcija	X+P	34 U (ksilanaza) + 0,4 U (pektinaze)	tretman kombinacijom ksilanaze i pektinaza (30 min, pH 5,5, 50 °C) + alkalna ekstrakcija (1 h, pH 10,5, 50 °C)

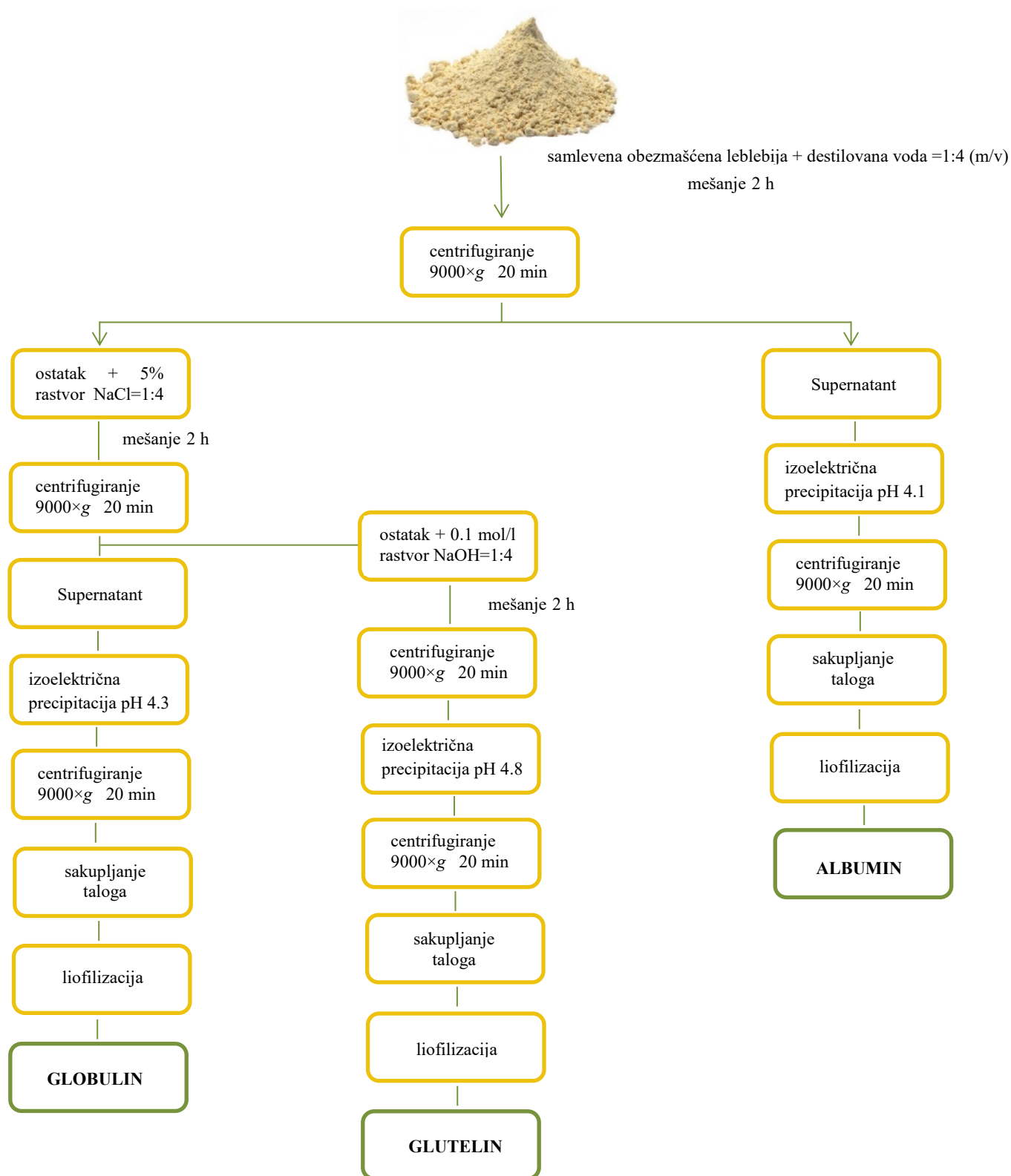
3.4.4. Izdvajanje i sušenje proteinskih izolata

Po završetku alkalne i enzimima potpomognutih alkalnih ekstrakcija, suspenzije su centrifugirane na 9000×g tokom 15 minuta na 4 °C. Sadržaj proteina u ekstrakcionim ostacima je određen je metodom po *Kjeldahl*-u (AOAC 991.20).

Supernatanti su podvrgnuti izoelektričnoj precipitaciji podešavanjem pH sa 1 mol/l HCl na 4,5. Proteinski talog je sakupljen nakon centrifugiranja (9000×g, 15 min, 4 °C) i rastvoren u destilovanoj vodi na pH 7. Pripremljeni proteinski rastvori su podvrgnuti sušenju u liofilizatoru (*Martin Crist Alpha LSC 2-4, Osterode, Nemačka*) na - 45 °C tokom 48 h a nakon sušenja dobijeni proteinski izolati su do upotrebe čuvani u eksikatoru. Proteinski izolati - ALK-izolat iz alkalne ekstrakcije, ARA-izolat iz alkalne ekstrakcije potpomognute arabinofuranozidazom, i (X+C)-izolat iz alkalne ekstrakcije potpomognute kombinacijom celulaza i ksilanaze, su dalje analizirani i korišćeni u eksperimentima.

3.5. Priprema frakcija proteina

Frakcije proteina leblebije - albuminska, globulinska i glutelinska pripremljene su prema metodu *Chang et al.* (2011), šematski prikazanom na slici 6.



Slika 6. Šema izdvajanja frakcija proteina leblebije

Proteinski talozi su sakupljeni nakon centrifugiranja i rastvoreni u destilovanoj vodi na pH 7. Pripremljeni rastvori frakcija proteina su sušeni liofilizacijom na - 45 °C tokom 48 h a nakon sušenja dobijene frakcije (albuminska - ALB, globulinska - GLO i glutelinska - GLU) su čuvane u eksikatoru do analiza i korišćenja u eksperimentima. Izoelektrične tačke dobijenih frakcija određene su merenjem zeta (ζ) potencijala rastvora ovih frakcija u opsegu pH 1 - 9, na uređaju *Zetasizer Nano ZS90* (Malvern Instruments Ltd., UK).

3.6. Hemijski sastav proteinskih izolata i frakcija proteina

Sadržaj suve materije određen je sušenjem do konstantne mase na temperaturi od 105±0.5 °C. Sadržaj pepela određen je gravimetrijskim metodom, sušenjem na 550 °C do konstantne mase. Sadržaj proteina određen je metodom po *Kjeldahl*-u (AOAC 991.20). Sadržaj skroba određen je pomoću komercijalnog kompleta za određivanje ukupnog skroba (*Total starch kit K-TSTA, Megazyme*) (AACC 76-13-01).

3.7. Preparativna hromatografija sa hidrofobnim interakcijama

Preparativna hromatografija sa hidrofobnim interakcijama (eng. *Hydrophobic interaction chromatography* – HIC) rađena je na HPLC sistemu *Agilent 1290 Infinity I* sa kolonom *BioSuite Phenyl (Preparative, 21,5×150 mm, 10 μm, Waters)*. Eluiranje je vršeno u gradijentnim koracima dobijenim mešanjem mobilnih faza A i B, gde je faza A predstavljala 1 mol/l amonijum-sulfat u 25 mmol/l Tris-HCl puferu, pH 9, dok je faza B predstavljala 25 mmol/l Tris-HCl pufer pH 9. Protok mobilne faze je iznosio 1 ml/min, eluiranje je vršeno smanjenjem koncentracije soli prema gradijentnim koracima – 100% A (I), 80% A (II), 60% A (III), 40% A (IV) i 0% A (V), na temperaturi od 25 °C uz detekciju proteinskih frakcija na 280 nm (*Agilent DAD*).

U preparativnom razdvajanju proteina korišćen je proteinski izolat dobijen iz alkalne ekstrakcije potpomognute α -L-arabinofuranozidazom. Uzorak je rastvoren u 1 mol/l amonijum-sulfatu koji je prethodno rastvoren u 25 mmol/l Tris-HCl puferu, pH 9, a zatim filtriran kroz filter 0,45 μm, da bi 5,35 mg proteina rastvorenih u 5 ml bilo injektovano preko *Rheodyne 7010/7125* injektora (*Thermo Fisher Scientific, USA*).

Sve eluirane frakcije su podvrgnute ultrafiltraciji u cilju njihovog koncentrisanja (ultrafiltraciona čaša *Amicon stirred cell* (model 8010, *Millipore, USA*), membrana (*Biomax®*, *Millipore, USA*) *cut-off* 5 kDa, natpritisak 2,5 bara, temperatura 4 °C, mešanje 30 o/min, faktor koncentrisanja u rasponu od 14 do 28).

3.8. Analitički metodi

3.8.1 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

FTIR spektri proteinskih izolata, frakcija proteina i frakcija eluiranih sa kolone snimani su na *Bruker ALPHA* spektrofotometru (*Bruker, Nemačka*) sa ATR dijamantskim modulom, koji je bio povezan sa računarnom zbog softverske obrade podataka. Spektri su snimani u opsegu talasnog broja od 4000 do 400 cm⁻¹, pri rezoluciji od 4 cm⁻¹.

Sadržaj sekundarnih strukturnih elemenata (α -heliks, β -ploča, nasumični kalemovi, β -zavoji) određen je preko dobijenih spektara u intervalu od 1600 cm⁻¹ do 1700 cm⁻¹. Spektri su fitovani Gausovom krivom raspodele u programu *Origin* (*OriginLab Corporation, SAD*) a primenom drugog izvoda određeni su položaji pikova koji su kasnije bili osnova za izračunavanje procentualnog sadržaja elemenata sekundarne strukture.

3.8.2. Aminokiselinski sastav

Aminokiselinski sastav proteinskih izolata i frakcija proteina određen je korišćenjem automatskog aminoanalizatora *Biochrom 30+* (*Biochrom, Cambridge, UK*), prema metodu *Spackman et al.* (1958). Razdvajanje aminokiselina izvršeno je primenom hromatografije sa izmenom katjona, praćene bojenom reakcijom sa ninhidrinom i fotometrijskom detekcijom na 570 nm (za sve aminokiseline osim prolina) i 440 nm (za prolin). Uzorci proteinskih izolata i frakcija proteina su prvobitno hidrolizovani 6 mol/l HCl ili 4,2 mol/l NaOH (za određivanje triptofana) na 110 °C tokom 24 h, a zatim ohlađeni na sobnu temperaturu. Posle hidrolize, uzorci su filtrirani kroz PTFE filter sa veličinom pora od 0,22 mm (*Plano, Teksas, SAD*) i dopunjeni do 25 ml natrijum-citratnim puferom (pH 2,2). Nakon ovog koraka, uzorci su ponovo filtrirani kroz PTFE filter i analizirani. Rezultati su izraženi kao masa aminokiseline (g) u 100 g suve materije uzorka (*Tomičić et al.*, 2020).

3.8.3. Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza

Izolati iz alkalnih i kombinovanih enzimskih i alkalnih ekstrakcija, kao i frakcije proteina leblebije i uzorci razdvojeni preparativnom HIC su analizirani natrijum-dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforezom (SDS-PAGE). Elektroforeza je vođena na 12% TruPAGE gelovima (*Sigma Aldrich, Taufkirhen, Nemačka*) pod redukujućim uslovima (*Laemmli, 1970*). Uzorci od 10 µL (koncentracije 2 mg/ml) su aplikovani u prostore predviđene za nanošenje uzoraka na gelu, a proces razdvajanja se vršio pri naponu 180 V i jačini struje 100 mA tokom 45 min u *omniPAGE Vertical Electrophoresis System* (model CVS10DSYS, *Cleaver Scientific Ltd., UK*). Nakon elektroforetskog razdvajanja, gelovi su obojeni u rastvoru *Coomassie Blue R250*. Posle obezbojavanja u bidestilovanoj vodi, relativne molekulske mase proteinskih traka određivane su upoređivanjem sa proteinskim markerima molekulskih masa u opsegu od 7 do 240 kDa (*SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Nemačka*).

3.8.4. Rastvorljivost

Uzorci proteinskih izolata i frakcija proteina koncentracije 10 mg/ml (C_1) su dispergovani u destilovanoj vodi. Vrednost pH je podešena na 9 sa 1 mol/l NaOH i održavana konstantnom tokom celokupnog procesa rastvaranja. Rastvor je mešan na magnetnoj mešalici na sobnoj temperaturi 4 h i ostavljen preko noći na 4 °C radi bolje hidratacije proteina. Da bi se uklonile čestice poreklom od nerastvorenog proteinskog uzorka, rastvor je centrifugiran na 9000×g tokom 10 minuta na 4 °C. Koncentracija proteina u supernatantu (C_2) je analizirana *Bradford* metodom (1976) sa goveđim serum albuminom (BSA) kao standardom i korišćena je za izračunavanje rastvorljivosti prema jednačini (1):

$$\text{Rastvorljivost (\%)} = \frac{C_2}{C_1} 100 \quad (1)$$

3.8.5. Kapaciteti zadržavanja vode i ulja

Kapacitet zadržavanja vode (WHC) i kapacitet zadržavanja ulja (OHC) proteinskih izolata i frakcija proteina određeni su prema metodu *Tan et al.* (2014). Uzorcima (0,1 g) su dodati po 1,5 ml destilovane vode ili suncokretovog ulja (gustina 0,912 g/ml) i vorteksirani su u trajanju od 1 minuta. Nakon 30 min na sobnoj temperaturi, uzorci su centrifugirani na 5000×g tokom 30 min. Dobijeni supernatanti su pažljivo dekantovani a masa taloga izmerena. WHC i OHC su izraženi kao gram zadržane vode/ulja po gramu uzorka.

3.8.6. Kapaciteti pene i stabilnost pene

Kapacitet pene (FC) i stabilnost pene (FS) određeni su rastvaranjem proteinskih uzoraka u destilovanoj vodi kako bi se pripremio rastvor konačne koncentracije 5 mg/ml. Nakon što je pH podešen na 9 korišćenjem 1 mol/l NaOH, rastvori su homogenizovani aparatom *Ultra-Turrax* (T-25, IKA) 10 minuta na 25 °C i 15000 o/min. Zabeležena je ukupna zapremina pre i posle homogenizovanja, kao i ukupna zapremina pene i zapremina preostale pene nakon 30 min. Kapacitet pene i stabilnost pene su izračunati prema jednačinama (2) i (3), redom:

$$FC (\%) = \frac{\text{zapremina nakon homogenizovanja} - \text{zapremina pre homogenizovanja}}{\text{zapremina nakon homogenizovanja}} 100 \quad (2)$$

$$FS (\%) = \frac{\text{zapremina pene nakon 30 min}}{\text{ukupna zapremina pene}} 100 \quad (3)$$

3.8.7. Emulgjuća svojstva

Emulgjuća svojstva proteinskih izolata i frakcija proteina merena su metodom koju su opisali *Wu et al.* (1998). Emulzije su pripremljene dispergovanjem smeše suncokretovog ulja i rastvora proteina (5 mg/ml, pH 7,0), u odnosu 1:6 (v/v), aparatom *Ultra-Turrax* T-25 na 18000 o/min tokom 1 minuta. Porcije od 50 mikrolitara emulzija su pipetirane sa dna čaše odmah nakon dispergovanja i u 10-om minutu nakon dispergovanja. Uzorci su razblaženi do 5 ml 0,1% rastvorom SDS-a i apsorbance ovako razblaženih emulzija su merene na 500 nm. Tako dobijene vrednosti apsorbanci A_0 i A_{10} , za razblažen uzorak odmah nakon i 10 minuta nakon dispergovanja, redom, su korišćene za izračunavanje indeksa aktivnosti emulgovanja (EAI) i indeksa stabilnosti emulzije (ESI) prema jednačinama (4) i (5), redom:

$$EAI (m^2/g) = 2 \times T \times A_0 \times \text{faktor razblaženja} / (C \times \phi \times 10000) \quad (4)$$

gde je $T = 2,303$; faktor razblaženja = 100, C = koncentracija proteina (g/ml) pre formiranja emulzije i ϕ = zapreminski udeo ulja u emulziji.

$$ESI (\text{min}) = A_0 \times \Delta t / \Delta A \quad (5)$$

gde je $\Delta t = 10$ min i $\Delta A = A_0 - A_{10}$.

3.8.8. Površinska hidrofobnost

Površinska hidrofobnost uzoraka određivana je preko količine vezanog bromfenol plavog (BPB) za analizirani proteinski uzorak metodom koju su opisali *Chelh et al.* (2006). Dvesto μ l rastvora BPB (1 mg/ml BPB u destilovanoj vodi) je dodato u 1 ml rastvora proteina (2 mg/ml u 20 mmol/l fosfatnom puferu, pH 7) i vorteksirano. Kontrolni uzorak je pripremljen sa 1 ml fosfatnog pufera umesto rastvora proteina. Test i kontrolni uzorci su mešani 10 min na sobnoj temperaturi i centrifugirani (2000 \times g, 15 min). Apsorbanca supernatanta je merena na talasnoj dužini od 595 nm sa fosfatnim puferom kao slepom probom. Masa vezanog BPB-a (od strane 2 mg proteina u analizi) računata je pomoću jednačine (6):

$$\text{Vezani BPB } (\mu\text{g}) = 200 \frac{A_0 - A_1}{A_0} \quad (6)$$

gde 200 predstavlja masu BPB u analizi (μ g), A_0 i A_1 apsorbance kontrole i uzorka, redom.

3.8.9. Sadržaj ukupnih i reaktivnih sulfhidrilnih (SH) grupa

Sadržaj ukupnih i reaktivnih sulfhidrilnih grupa u uzorcima proteina određen je spektrofotometrijski uz pomoć Elmanovog reagensa (5,5'-(ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina, DTNB), prema metodu *Beveridge et al.* (1974) sa izvesnim modifikacijama. Uzorci proteina su rastvoreni u standardnom puferu (pH 8) tako da konačna koncentracija bude 0,5 mg/ml i centrifugirani su na 9000×g u trajanju od 20 minuta na 4 °C. Standardni pufer se sastojao od 0,086 mol/l Tris baze, 0,09 mol/l glicina, 4 mmol/l EDTA i 8 mol/l uree (za analizu ukupnih SH) ili bez 8 mol/l uree (za analizu reaktivnih SH). Zatim je u 2,5 ml rastvora proteina dodato 0,025 ml Elmanovog reagensa (4 mg DTNB/ml u standardnom puferu bez uree). Smeša je ostavljena da stoji na sobnoj temperature tokom 1 h i apsorbancija je izmerena na 412 nm. Merenja su izvršena u odnosu na slepu probu koja je spremljena po istoj proceduri, samo se umesto uzorka koristio standardni pufer bez uree (reaktivne grupe) ili sa ureom (ukupne grupe). Sadržaj SH grupa je izračunat pomoću jednačine (7) koju su izveli *Beveridge et al.* (1974):

$$\text{Sadržaj SH grupa } (\mu\text{mol/g}) = \frac{73.53 \times A}{C} D \quad (7)$$

gde je A - apsorbancija na 412 nm, C - koncentracija proteina (mg/ml) i D -faktor razblaženja (1,01).

3.8.10. *In vitro* antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost uzoraka određena je spektrofotometrijskim metodom prema *Re et al.* (1999) uz izvesne modifikacije. ABTS reagens je pripremljen mešanjem vodenog rastvora ABTS supstance (7 mmol/l) sa rastvorom kalijum-persulfata (2,45 mmol/l) u odnosu 1:1 (v/v). Smeša je inkubirana 16 h na sobnoj temperaturi, u mraku. Posle inkubacije, ABTS reagens je razblažen bidestilovanom vodom kako bi se postigla apsorbancija od $0,70 \pm 0,02$ na 734 nm. Uzorak proteina je rastvoren u slanom fosfatnom puferu (PBS), pH 7,0, da bi se dobila konačna koncentracija od 2 mg/ml. Alikvot uzorka od 50 μ l je pomešan sa 950 μ l razblaženog rastvora ABTS reagensa, vorteksiran 30 s i inkubiran na tamnom mestu i sobnoj temperaturi tokom 6 minuta. Kontrolni rastvor (bez antioksidativne aktivnosti) je pripremljen od 50 μ l PBS umesto uzorka proteina i 950 μ l razblaženog rastvora ABTS, dok je sam PBS korišćen kao slepa proba. Apsorbancija je merena na 734 nm i *in vitro* ABTS antioksidativna aktivnost (%) je izračunata korišćenjem jednačine (8):

$$\text{ABTS } (\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} 100 \quad (8)$$

gde su A_0 i A_1 apsorbance kontrole i uzorka, redom.

3.9. Priprema proteinskih nanočestica

Liofilizovani proteinski izolati i frakcije proteina su dispergovani u 50 mmol/l NaCl i pH vrednost je podešena na 9 pomoću 1 mol/l rastvora HCl. Rastvor natrijum-azida (0,02%, m/v) je dodat u cilju sprečavanja mikrobiološke kontaminacije. Mešanje na magnetnoj mešalici je trajalo 8 h, nakon čega su uzorci ostavljeni preko noći na 4 °C radi potpune hidratacije. Disperzije su, zatim, centrifugirane na 10000 o/min tokom 10 min da bi se eliminisali nerastvoreni ostaci. Supernatanti su odvojeni i sadržaj proteina je određen Bradfordovim metodom (*Bradford, 1976*) sa BSA kao standardom.

3.9.1. Termički tretman

Za pripremu proteinskih nanočestica termičkim tretmanom, supernatanti su razblaženi 50 mol/l rastvorom NaCl do postizanja koncentracije 0,1% i 0,4% (m/v). pH vrednosti su podešene na 7 i 9,3 korišćenjem 0,5 mol/l NaOH i 0,5 mol/l HCl. Pripremljene disperzije su zagrevane u vodenom kupatilu na 65 °C i 90 °C u trajanju od 10 i 20 min, a nakon toga hlađene. Na ovaj način pripremljene proteinske nanočestice su čuvane na 4 °C do daljeg analiziranja.

3.9.2. Ultrazvučni tretman

Za pripremu proteinskih nanočestica ultrazvučnim tretmanom, supernatanti su razblaženi 50 mol/l rastvorom NaCl do postizanja koncentracije 0,1% i 0,4% (m/v). pH vrednosti su podešene na 7 i 9,3 i pripremljene disperzije su tretirane u ultrazvučnom kupatilu (UZ 4P, Iskra) u trajanju od 10 i 20 min, na sobnoj temperaturi, pod uslovima frekvencije 30 kHz i snage 500 W.

3.10. Karakterizacija proteinskih nanočestica

3.10.1. Mutnoća

Pojava mutnoće proteinskih disperzija pod uticajem termičkog tretmana (90 °C) nakon 10 i 20 minuta je merena na 400 nm, po metodu *Shen et al.* (2017), uporedo sa merenjem mutnoće netretiranog rastvora proteina. Merenja su vršena na sobnoj temperaturi u kvarcnoj kivetu (dužina 1 cm). Rastvor NaCl koncentracije 50 mol/l je korišćen kao slepa proba.

3.10.2. Raspodela veličina čestica

Određivanje raspodele veličine čestica, njihovog srednjeg prečnika i indeksa polidisperznosti (PdI) se zasnivalo na merenju dinamičkog rasipanja svetlosti (DSL). Ovi parametri mereni su pre i posle termalnog tretmana rastvora proteinskih izolata i frakcija proteina na uređaju *Zetasizer Nano ZS90* (*Malvern Instruments Ltd.*, UK). Indeksi prelamanja za rastvarač i proteinske agregate iznosili su 1,33 i 1,5, redom. Raspodela veličina čestica je prikazana grafički, gde je na x–osi predstavljen interval prečnika, a na y–osi udeo čestica datog prečnika u ukupnom broju/zapremini svih čestica.

Ostali parametri pripremljenih nanočestica su izračunati na osnovu srednjeg prečnika čestica (nm), uzimajući u obzir da su čestice sfernog oblika (*Sponton et al.*, 2016) i to:

- prečnik nanočestice (d) – srednji prečnik (nm)
- površina nanočestice (A) – $4 \pi d^2$
- zapremina nanočestice (V) – $\pi d^3/6$
- odnos površine (A) i zapremine (V) = A/V
- odnos površinske hidrofobnosti (PH) i površine nanočestice (A) = PH/A

3.10.3. Stabilnost proteinskih nanočestica

Stabilnost pripremljenih nanočestica analizirana je praćenjem promena njihovog srednjeg prečnika i zeta potencijala neposredno nakon pripreme i nakon skladištenja tokom 3, 5 i 7 dana na temperaturi 4 °C, na uređaju *Zetasizer Nano ZS90* (*Malvern Instruments Ltd.*, UK).

3.10.4. Površinska hidrofobnost proteinskih nanočestica

Površinska hidrofobnost proteinskih nanočestica ispitana je prema metodu *Chelh et al.* (2006), kao što je opisano u potpoglavlju 3.8.8.

3.10.5. Kapacitet vezivanja linolne kiseline

Mogućnost vezivanja hidrofobnih supstanci od strane nanočestica pripremljenih od proteinskih izolata i frakcija proteina leblebije određena je sa linolnom kiselinom (LA) prema metodu *Sponton et al.* (2020). Kapacitet vezivanja linolne kiseline (BC) je izračunat prema jednačini (9):

$$BC (\%) = 100 \times (A_{LA} - A_{LA-P})/A_{LA} \quad (9)$$

gde su A_{LA} i A_{LA-P} - apsorbanca rastvora LA sa i bez proteinskih nanočestica, redom.

3.10.6. Kapacitet vezivanja askorbinske kiseline

Interakcija između askorbinske kiseline (AA), kao hidrofilnog jedinjenja, i nanočestica pripremljenih od proteinskih izolata i frakcija proteina određena je metodom *Maciel-a et al.* (2013) sa nekim modifikacijama (*Zhong et al.*, 2004). Pripremljene disperzije proteinskih nanočestica su razblažene 50 mmol/l rastvorom NaCl da bi se postigla konačna koncentracija od 0,05 mg/ml. Rastvor AA je pripremljen rastvaranjem ovog jedinjenja u destilovanoj vodi na pH 3 do koncentracija 0,1 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,25 mg/ml i 0,5 mg/ml. Zapremina od 3,6 ml disperzije proteinskih nanočestica je pomešana sa 57 μ L rastvora AA različitih koncentracija, nakon čega je merena apsorbanca na 280 nm. Konstanta vezivanja AA je računata prema *Benesi-Hildebrand* jednačini (*Maciel et al.*, 2013):

$$\frac{1}{A-A_0} = \frac{1}{K \cdot \epsilon \cdot C_p \cdot C_{AA}} + \frac{1}{C_p \cdot \epsilon} \quad (10)$$

odnosno, konstruisanjem grafika

$$\frac{1}{A-A_0} = f\left(\frac{1}{C_{AA}}\right) \quad (11)$$

gde su C_p i C_{AA} - koncentracije proteina i askorbinske kiseline (mol/l), redom; ϵ – molarni ekstinkcioni koeficijent AA (l/mol·cm); A i A_0 - apsorbanca disperzija proteinskih nanočestica sa i bez AA, redom; K - konstanta vezivanja askorbinske kiseline (l/mol).

3.11. Statistička obrada eksperimentalnih podataka

Svi eksperimenti su izvedeni u tri ili više ponavljanja i rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija za svako merenje. Statistička analiza je urađena korišćenjem programa *Statistica* (TIBCO Software Inc.). Analiza podataka obuhvatala je procenu statističke značajnosti između aritmetičkih sredina rezultata korišćenjem jednostruke (*One-way ANOVA*) analize varijanse praćene naknadnim *Tukey* testom. Različita slova u eksponentu nad rezultatima predstavljaju statistički značajne razlike određene prema *Tukey*-ovom testu sa nivoom značajnosti od 0,05. Na osnovu statističke analize, razlika u rezultatima je ocenjivana kao značajna ($p < 0,05$), veoma značajna ($p < 0,01$) i visoko značajna ($p < 0,001$).

4. Rezultati i diskusija

4.1. Proteinski izolati leblebije i njihova svojstva

U ovom delu doktorske disertacije prikazani su rezultati dobijanja proteina postupcima alkalne ekstrakcije leblebije, sa i bez upotrebe enzima, kao i određivanja karakteristika i svojstava dobijenih proteinskih izolata. Analizirani su hemijski sastav, aminokiselinski sastav, kao i elektroforetski profili dobijenih proteinskih izolata. Takođe, ispitane su i različite funkcionalne osobine koje su važne za potencijalnu primenu proteinskih izolata u prehrambenoj industriji. Dobijenim proteinskim izolatima određena je funkcionalnost u smislu njihove rastvorljivosti, kapaciteta zadržavanja vode i ulja, emulgujućih karakteristika i mogućnosti stvaranja pene. Osim toga, analizirane su i njihove biološke osobine u pogledu posedovanja *in vitro* antioksidativne aktivnosti. Dobijeni proteinski izolati poređeni su međusobno kako bi se utvrdio uticaj enzimskih pretretmana na njihov sastav i osobine.

4.1.1. Karakterizacija polazne sirovine

Pre samog postupka ekstrakcije, sirovina iz koje će protein biti dobijen je okarakterisana u pogledu hemijskog sastava. U prvom koraku, seme leblebije Kabuli tipa samleveno je u laboratorijskom mlinu i prosejano kroz laboratorijsko sito. U ovako pripremljenoj sirovini određen je sadržaj masti koji je u 100 g suve materije iznosio $3,75 \pm 0,01$ g. Zbog toga je izvršeno obezmašćivanje sirovine uz pomoć dvostepene ekstrakcije. U cilju izbegavanja štetnih efekta koje ima heksan kao najzastupljeniji rastvarač za obezmašćivanje (Russin *et al.*, 2011), korišćen je etanol. Hemijski sastav ovako pripremljenog brašna leblebije, iz koje će se vršiti ekstrakcija proteina, prikazan je u tabeli 4.

Tabela 4. Hemijski sastav obezmašćene leblebije nakon dvostepene ekstrakcije etanolom

Komponenta	Sadržaj g/100 g _{SM}
proteini	23,06±0,05
ukupna vlakna (TDF)	16,40±0,53
nerastvorljiva vlakna (IDF)	14,80±0,05
rastvorljiva vlakna (SDF)	1,60±0,48
skrob	34,54±1,02
pepeo	3,25±0,07

Rezultati su pokazali da je sadržaj sirovih proteina u obezmašćenom brašnu leblebije iznosio $23,06 \pm 0,05$ g/100 g, što je u dobroj saglasnosti sa rezultatima koji su ranije objavljeni za brašno iz semena Kabuli tipa i koji su varirali u opsegu od 17,8 do 24,5 g/100 g (Ghribi *et al.*, 2015; Perez-Hidalgo *et al.*, 1997; Rincón *et al.*, 1998).

Sadržaj ukupnih (TDF) i nerastvorljivih (IDF) prehrambenih vlakana u obezmašćenom brašnu leblebije je ukazao na njihov dominantan udeo u odnosu na rastvorljiva (SDF) dijetetska vlakna. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodno objavljenim vrednostima za TDF (15 – 19,5 g/100 g) i IDF (12,5 – 15,3 g/100 g) za seme leblebije Kabuli tipa, dok je, sa druge strane, sadržaj

rastvorljivih prehrambenih vlakana pokazao nešto manju vrednost nego što je objavljeno u literaturi - od 2,5 do 12 g/100 g (Perez-Hidalgo et al., 1997; Rincon et al., 1998; Ghribi et al., 2015). Poznato je da se dijetetska vlakna u semenu mahunarki mogu podeliti na ona tzv. “unutrašnja” i “spoljašnja” (Meuser, 2001; Tosh and Yada, 2010). “Spoljašnja” vlakna potiču iz omotača semena, koji sadrži u velikoj meri polisaharide nerastvorljive u vodi (celuloza, hemiceluloza), dok “unutrašnja” vlakna čine polisaharidi ćelijskog zida kotiledona, koji imaju različit stepen rastvorljivosti (Tosh and Yada, 2010). Kada je reč o leblebiji, omotač semena se uglavnom sastoji od celuloze i hemiceluloze, sa manjim udelom pektina (Zhong et al., 2018), dok u polisaharide u ćelijskim zidovima kotiledona spadaju celuloza, ksiloglukan, arabinan i pektin (Wood et al., 2018a). Bitno je napomenuti da na sadržaj neskrobnih polisaharida u semenu leblebije utiče genotip, ali i klimatski uslovi kojima je biljka izložena tokom kultivacije (Wood et al., 2018a).

Skrob predstavlja glavni polisaharid prisutan u kotiledonima semena leblebije i njegove vrednosti variraju u opsegu od 30,8% do 37,9% suve materije (Kaur and Prasad, 2021a). Sadržaj skroba u obezmašćenom brašnu leblebije od $34,54 \pm 1,02$ g/100 g je bio u skladu sa ovim literaturnim podatkom. Takođe, sadržaj pepela, $3,25 \pm 0,07\%$, je bio u skladu sa vrednostima koje su objavljene u literaturi (Iqbal et al., 2006; Özer et al., 2010).

4.1.2. Alkalna i enzimima potpomognuta alkalna ekstrakcija proteina leblebije

S obzirom na činjenicu da leblebija predstavlja važan izvor proteina, njihova ekstrakcija iz ove biljne sirovine predstavlja značajan izazov u pogledu ostvarivanja što većeg prinosa. Ekstrakcija proteina iz leblebije vršena je u alkalnim uslovima, što predstavlja uobičajen (konvencionalan) postupak za ekstrakciju biljnih proteina, i u unapređenom postupku koji je podrazumevao enzimski tretman sirovine pre alkalne ekstrakcije. Važno je napomenuti da ekstrakcija proteina iz leblebije kao biljne sirovine u enzimski potpomognutom procesu nije do sada ispitivana.

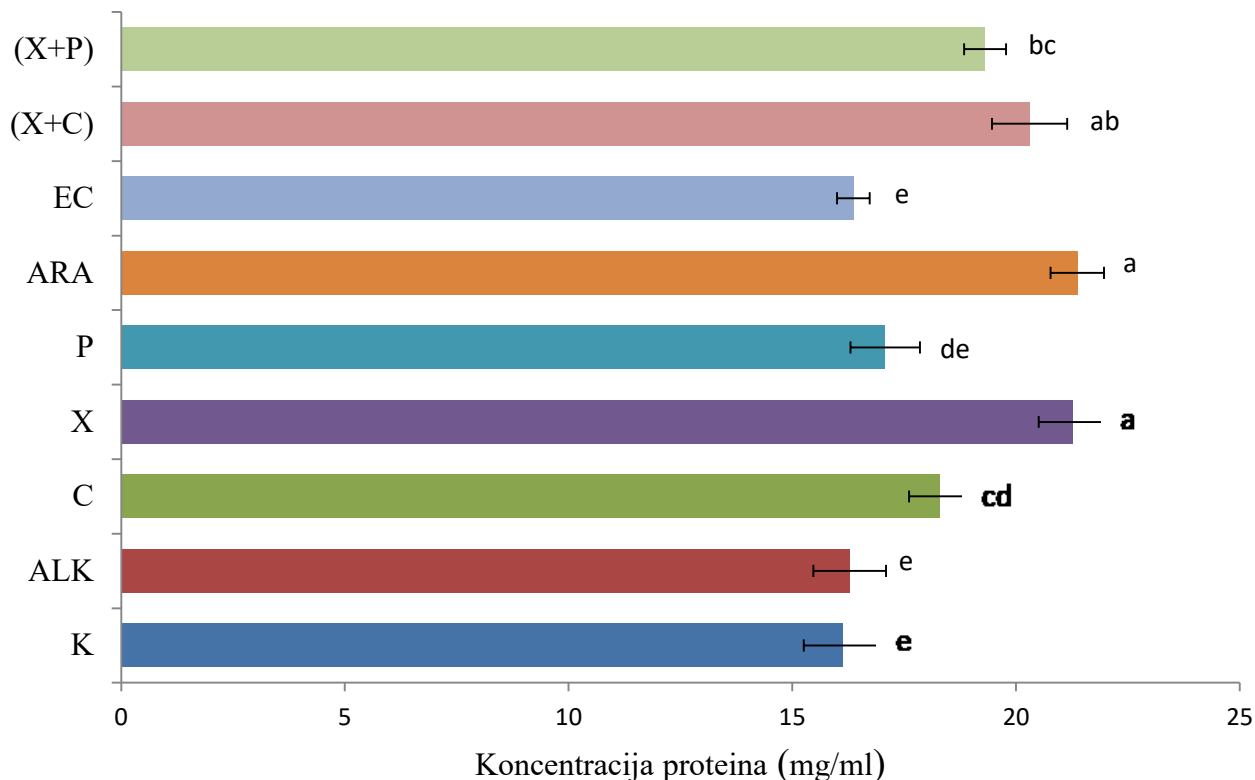
4.1.2.1. Testiranje enzima za tretman leblebije pre alkalne ekstrakcije

Različiti enzimi za razgradnju ćelijskog zida biljaka – celulaze, pektinaze, ksilanaza i arabinofuranozidaza (primenjeni pojedinačno ili u kombinaciji), kao i komercijalni koktel enzima, su testirani u tretmanu obezmašćene leblebije pre alkalne ekstrakcije proteina. Kao merilo njihovog učinka, određivana je koncentracija rastvorljivih proteina u tečnoj fazi nakon faze alkalne ekstrakcije. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 7, uporedo sa rezultatima koncentracije proteina iz postupaka alkalne ekstrakcije i kontrolne potpomognute alkalne ekstrakcije (faza pretretmana bez enzima).

Dobijeni rezultati su pokazali da nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji proteina između kontrole (30 minuta vodena + 1 h alkalna ekstrakcija) i alkalne ekstrakcije (1 h), na osnovu čega se moglo zaključiti da bi eventualno povećanje koncentracije proteina u enzimima potpomognutim alkalnim ekstrakcijama bilo isključivo posledica delovanja enzima.

Pretretmani pojedinačnim preparatom pektinaza i komercijalnim enzimskim koktelom nisu doveli do značajnijeg povećanja koncentracije proteina u tečnoj fazi nakon alkalne ekstrakcije sirovine. Nasuprot tome, primena svih ostalih testiranih enzima u pretretmanu leblebije je pokazala značajno povećanje koncentracije ekstrahovanih proteina leblebije u odnosu na alkalnu i kontrolnu ekstrakciju. Među njima, najveće vrednosti merenog pokazatelja efikasnosti pretretmana ostvarene su u ARA, X+C i X postupcima, sa značajnom razlikom ($p < 0,001$) u odnosu na ALK i K. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je upotreba pojedinačne arabinofuranozidaze i

ksilanaze, kao i kombinovanih pojedinačnih preparata ksilanaze i celulaza, u tretmanu koji je prethodio alkalnoj ekstrakciji, dovela do poboljšane razgradnje ćelijskog zida i olakšane ekstrakcije proteina iz leblebije.



K - kontrola, ALK - alkalna ekstrakcija, C - alkalna ekstrakcija potpomognuta celulazama, X - alkalna ekstrakcija potpomognuta ksilanazom, P - alkalna ekstrakcija potpomognuta pektinazama, ARA - alkalna ekstrakcija potpomognuta arabinofuranozidazom, EC - alkalna ekstrakcija potpomognuta komercijalnim enzimskim koktelom, X+C - alkalna ekstrakcija potpomognuta kombinacijom ksilanaze i celulaza, X+P - alkalna ekstrakcija potpomognuta kombinacijom ksilanaze i pektinaza. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema *Tukey*-ovom testu na nivou $p < 0,05$.

Slika 7. Koncentracija proteina u tečnoj fazi dobijena alkalnom i enzimima potpomognutim alkalnim ekstrakcijama obezmašćene leblebije

U cilju određivanja najpogodnijeg enzima za pretretman leblebije, proteinskim izolatima iz prethodno opisanih enzimima potpomognutih alkalnih ekstrakcija dodatno su određene neke funkcionalne osobine (rastvorljivost, kapacitet zadržavanja vode i ulja, emulgujuće osobine) koje su, pored prinosa, značajne za upotrebu u prehrambenoj industriji (rezultati nisu prikazani). Pokazalo se da je proteinski izolat dobijen iz ekstrakcije potpomognute ksilanazom posedovao lošiju rastvorljivost, niži kapacitet vezivanja vode i slabije emulgujuće karakteristike u odnosu na proteinske isolate iz ARA i (X+C) postupaka. Na osnovu svih merenih pokazatelja, u daljim eksperimentima enzimima potpomognutih alkalnih ekstrakcija korišćeni su preparat individualne arabinofuranozidaze i kombinacija preparata ksilanaze i celulaza.

4.1.2.2. Efikasnost alkalne i enzimima potpomognutih alkalnih ekstrakcija proteina leblebije

Rezultati preliminarnih ispitivanja trajanja alkalne ekstrakcije su pokazali da nije bilo razlike u koncentraciji proteina u supernatantu nakon jednočasovnog ($16,28 \pm 0,81$ mg/ml) i dvočasovnog postupka ($16,38 \pm 0,24$ mg/ml), te je narednim eksperimentima alkalna ekstrakcija trajala jedan sat. Prinos i efikasnost ekstrakcije su izračunati na osnovu sadržaja proteina u polaznoj sirovini i ekstrakcionom ostatku, određenih *Kjeldahl* metodom. Rezultati prinosa proteina iz obezmašćene leblebije dobijeni alkalnom ekstrakcijom (ALK), kao i alkalnim ekstrakcijama potpomognutim arabinofuranozidazom (ARA) i kombinacijom ksilanaze i celulaza (X+C) prikazani su u tabeli 5.

Tabela 5. Prinos proteina ekstrahovanih iz obezmašćene leblebije alkalnom ekstrakcijom sa ili bez enzimskog pretretmana

Ekstrakcija	Prinos (g/100 g _{SM})	Efikasnost ekstrakcije (%)
ALK	$15,76 \pm 0,57^b$	$68,36 \pm 11,44^b$
ARA	$21,59 \pm 0,32^a$	$93,62 \pm 6,48^a$
X+C	$21,42 \pm 0,06^a$	$92,89 \pm 1,28^a$

Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema *Tukey*-ovom testu na nivou $p < 0,05$

Rezultati su pokazali da je alkalnim postupkom ekstrahovano približno 16 g proteina/100 g suve materije, odnosno da je njegova efikasnost bila $68,36 \pm 11,4\%$, što znači da je iz obezmašćenog semena leblebije ekstrahovano približno dve trećine ukupnih proteina. Dobijeni rezultati za prinos proteina iz leblebije alkalnom ekstrakcijom su u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživača. *Papalamprou et al.* (2009) su pokazali da je prinos alkalne ekstrakcije proteina iz leblebije na pH 9 praćene izolektričnom precipitacijom, bio 54%. Takođe, alkalna ekstrakcija proteina iz leblebije Kabuli tipa ispitana je i u istraživanjima *Boye et al.* (2010b), na osnovu čega je utvrđeno da ovaj način ekstrakcije ima efikasnosti od 69%.

Kada je primenjen enzimski pretretman, bez obzira da li je korišćena pojedinačna arabinofuranozidaza ili kombinacija celulaza i ksilanaze, postignuta su veoma značajna poboljšanja prinosa proteina u poređenju sa alkalnom ekstrakcijom. Više od 21 g proteina/100 g_{SM} ekstrahovan je nakon enzimskog pretretmana obezmašćenog materijala, što je rezultiralo efikasnošću ekstrakcije iznad 90%. Shodno tome, primena arabinofuranozidaze ili kombinacije celulaza i ksilanaze dovela je do skoro potpune ekstrakcije proteina iz obezmašćene leblebije uz poboljšanje efikasnosti ekstrakcije za više od 25% u poređenju sa alkalnom ekstrakcijom. Takođe treba primetiti da su rezultati prinosa i efikasnosti ekstrakcije proteina, dobijeni na ovaj način, bili konzistentni sa onima dobijenim tokom testiranja enzima u pogledu procene efekta enzimskih pretretmana.

Povećana sposobnost izolovanja proteina u ekstrakcijama potpomognutim enzimima može se objasniti ulogom enzima u hidrolizi polisaharidnih komponenti ćelijskog zida koja, posledično, dovodi do povećane dostupnosti proteina i njihove poboljšane ekstrakcije iz kotiledona, kao i iz omotača semena leblebije. Utvrđeno je da je udeo polisaharida ćelijskog zida kotiledona u ukupnoj suvoj masi semena leblebije relativno mali – od približno 5 - 6% (*Wood et al.*, 2018b) do 13,7% (*Champ et al.*, 1986). Iako se može učiniti da su polisaharidi ćelijskog zida zastupljeni sa malim udelom u poređenju sa udelom skroba i proteina, bitno je napomenuti da polisaharidi ćelijskog zida

imaju važnu ulogu u ekstrakcionim procesima (Wood *et al.*, 2018b). Naime, dokazano je da su arabinoza, galakturonska kiselina i glukoza najzastupljeniji šećeri u polisaharidima ćelijskog zida kotiledona leblebije (Champ *et al.*, 1986). Takođe, a u saglasnosti sa ovim monosaharidnim profilom, analiza glikozidnih veza je pokazala da su arabinan (54%), celuloza (12,9%) i ksiloglukan (6,2%) glavni polisaharidi ćelijskog zida prisutni u kotiledonima leblebije (Wood *et al.*, 2018a). Veliki udeo terminalne arabinoze i 5-vezane arabinoze ukazuje na značajno prisustvo razgranatih arabinanskih polisaharida u ćelijskom zidu kotiledona leblebije; pored toga, utvrđeno je da je sadržaj arabinoze na drugom mestu među monosaharidima i uronskim kiselinama u rastvorljivim i nerastvorljivim vlaknima celog semena leblebije (Brummer *et al.*, 2015).

Poznato je da je α -L-arabinofuranozidaza hidrolitički enzim koji deluje na bočni lanac arabinoze prisutan na α -1,2-, α -1,3- i α -1,5-položajima u hemicelulozama (Poria *et al.*, 2020). Budući da je enzim odgovoran prvenstveno za uklanjanje grananja u polisaharidima, on se najčešće smatra pomoćnim enzimom koji pomaže drugim enzimima da efikasno hidrolizuju polisaharidne lanace (Thakur *et al.*, 2019). Pored toga, utvrđeno je da su veze između šećera koji izgrađuju polisaharide važnije od vrste šećera, naročito s aspekta povezivanja različitih polisaharida, što posledično određuje svojstva kompleksnog matriksa koji stvaraju (Morris, 2001). Dakle, arabinofuranozidaza primenjena kao individualni enzim u tretmanu pre alkalne ekstrakcije bila je podjednako uspešna kao i kombinacija celulaza i ksilanaze u poboljšanju ekstrakcije proteina iz semena leblebije. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodno navedenim podacima vezanim za značaj arabinoze i arabinana, kao i interferirajućih veza u matriksu ćelijskog zida leblebije.

Pored leblebije, ispitivanja alkalne ekstrakcije potpomognute istim enzimskim preparatima u cilju dobijanja proteinskih izolata vršena su na još jednoj mahunarki – soji. Rezultati su pokazali da su komercijalni koktel i kombinacija individualnih karbohidraza bili najefikasniji u poboljšanju prinosa proteina iz ove biljne sirovine (Perović *et al.*, 2020). Uzimajući, dakle, sve u obzir, može se zaključiti da izbor enzima koji će se primenjivati u pretretmanu sirovine pre alkalne ekstrakcije treba da bude adekvatan materijalu koji se ekstrahuje, odnosno njegovim karakteristikama u pogledu hemijskog sastava i strukture ćelijskog zida.

4.1.3. Hemijski sastav proteinskih izolata leblebije

Proteinski izolati dobijeni iz alkalne i enzimima potpomognutih alkalnih ekstrakcija okarakterisani su u pogledu osnovnog hemijskog sastava. Rezultati određivanja sadržaja proteina, skroba i pepela (računati na suhu materiju izolata) prikazani su u tabeli 6.

Tabela 6. Hemijski sastav proteinskih izolata dobijenih nakon alkalne i enzimima potpomognutih alkalnih ekstrakcija leblebije

Sadržaj (%)	ALK-izolat	ARA-izolat	(X+C)-izolat
Proteini	84,35±2,28 ^a	85,84±1,45 ^a	87,28±0,65 ^a
Skrob	0,01±0,00 ^b	0,02±0,03 ^b	0,15±0,00 ^a
Pepeo	2,91±0,01 ^b	3,58±0,17 ^a	2,89±0,00 ^b

Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema Tukey-ovom testu na nivou $p < 0,05$

Poznato je da hemijski sastav proteinskih izolata osim od vrste biljke tj. biljne sirovine iz koje je vršena ekstrakcija, zavisi i od načina i procesnih uslova korišćenih tokom izolovanja (Shevkani et al., 2019). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su svi proteinski izolati imali visok (>80%) sadržaj proteina; iako su se vrednosti sadržaja proteina u izolatima razlikovale, ta razlika nije bila statistički značajna. Visok sadržaj proteina u svim dobijenim izolatima (>80%) je potvrdio da pripadaju ovim proteinskim proizvodima (Akharume et al., 2021). Slični rezultati za sadržaj proteina objavljeni su u istraživanjima drugih naučnih grupa i to za alkalne proteinske izolate leblebije (Paredes-Lopez et al., 1991), graška (Gao et al., 2020), sočiva (Suliman et al., 2006), soje (Wang et al., 2004) i pirinča (Paraman et al., 2008).

Rezultati iz tabele 6 takođe pokazuju da je izolat iz ekstrakcije potpomognute arabinofuranozidazom imao najveći sadržaj pepela, dok su alkalni izolat i izolat iz ekstrakcije potpomognute kombinacijom celulaza i ksilanaze sadržali manji ali približno jednak udeo pepela. Sadržaj pepela u ALK-izolatu je bio u saglasnosti sa literaturnim podatkom od $2,90 \pm 0,30\%$ (Sánchez-Vioque et al., 1999). Sadržaj skroba je bio nizak (< 1%) u svim proteinskim izolatima. Poznato je da se varijacije u sadržaju proteina mogu pripisati varijacijama u sadržaju skroba; naime, postoji negativna korelacija između ova dva pokazatelja (Lam et al., 2018). Ovakva povezanost sadržaja proteina i skroba kod sva tri dobijena proteinska izolata leblebije nije postojala.

4.1.4. Sekundarna struktura proteinskih izolata leblebije

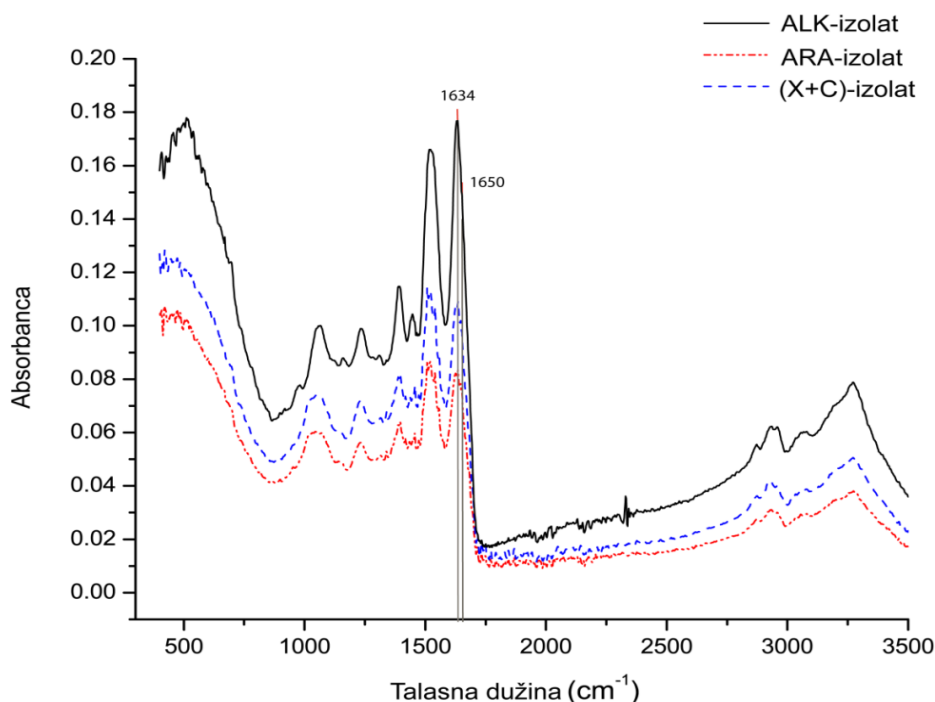
FTIR spektroskopija je, kao jedna od tehnika za procenu sekundarne strukture proteina, korišćena za analizu strukturnih karakteristika proteinskih izolata. Dobijeni FTIR spektri izolata pripremljenih alkalnim i enzimima potpomognutim alkalnim ekstrakcijama obezmašćene leblebije su prikazani na slici 8.

Poznato je da se tzv. amid I region ($1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) prvenstveno koristi za analizu sekundarne strukture i konformacionih promena proteina. Intenzivne pozicije pikova oko 1654 cm^{-1} , 1633 cm^{-1} (i 1684 cm^{-1}) i 1672 cm^{-1} su karakteristične za α -helikse, β -ravni (β -lance) i β -zavoje, redom, kao glavne elemente sekundarne strukture proteina (Shevkani et al., 2019). Dobijeni rezultati su pokazali da su proteinski izolat dobijen nakon alkalne ekstrakcije i izolati iz enzimima potpomognutih alkalnih ekstrakcija pokazali razlike u FTIR spektrima, kao odraz razlika u sekundarnoj strukturi. Izolat iz alkalne ekstrakcije pokazao je relativno veću apsorbanu na 1634 cm^{-1} u poređenju sa izolatima dobijenim uz pomoć enzima, dok je na 1650 cm^{-1} apsorbanca bila veća kod izolata dobijenih uz enzimski pretretman u poređenju sa alkalnim bez enzimskog tretmana.

Na osnovu FTIR spektara, izračunati su udeli elemenata sekundarne strukture u proteinskim izolatima (tabela 7). Dobijene vrednosti udela različitih tipova sekundarne strukture proteina potvrdili su razlike među analiziranim proteinskim izolatima. Najveće razlike su se odnosile na sadržaj α -heliksa i β -ravni, i to kod proteinskih izolata ekstrahovanih uz pomoć enzimskog pretretmana u poređenju sa alkalnim postupkom bez enzima.

Dobijeni rezultati su pokazali da je udeo α -heliksa u sekundarnoj strukturi proteina bio veći u ARA- i (X+C)-izolatima i, suprotno, da je udeo β -ravni bio veći u sekundarnoj strukturi proteinskog izolata dobijenog nakon samo alkalne ekstrakcije. Poznato je da su udeli α -heliksa i β -ravni u sekundarnoj strukturi proteina u frakcijama albumina, globulina i glutelina kod mahunarki različiti (Makeri et al., 2017). Dakle, razlike u intenzitetima pikova na pozicijama FTIR spektara koje odgovaraju različitim elementima sekundarne strukture mogu ukazivati na različit sastav izolata u

smislu odnosa između albumina, globulina i glutelina u njima, kao rezultata različitih protokola ekstrakcije.



Slika 8. FTIR spektri ALK-, ARA- i (X+C)-proteinskih izolata leblebije

Tabela 7. Udeo elemenata sekundarne strukture proteinskih izolata leblebije na osnovu FTIR analize

	α -heliks (%)	β -ravan (%)
ALK-izolat	17	59
ARA-izolat	26	41
(X+C)-izolat	29	40

4.1.5. Aminokiselinski sastav proteinskih izolata leblebije

Sa stanovišta ishrane, biljni proteini mogu obezbediti dovoljne količine esencijalnih aminokiselina za potrebe ljudskog organizma. Poznato je da svaki proteinski izolat ima jedinstven aminokiselinski sastav koji određuje njihova svojstva ali i njihov nutritivni kvalitet. Pored toga što leblebija sadrži dvostruko veću količinu proteina u poređenju sa žitaricama, smatra se da može poboljšati nutritivnu vrednost ishrane zasnovane na njima zbog svog dobro izbalansiranog aminokiselinskog sastava (Iqbal et al., 2006). Aminokiselinski sastav proteinskih izolata leblebije, dobijenih iz alkalne i enzimima potpomognutih alkalnih ekstrakcija, prikazan je u tabeli 8.

Rezultati su pokazali da su u svim izolatima bile dominantno prisutne glutaminska (~11 g/100 g_{SM} proteinskog izolata) i asparaginska kiselina (~7 g/100 g_{SM} proteinskog izolata), koje su literaturno potvrđene kao glavne aminokiseline proteina leblebije (*Espinosa-Ramírez* and *Serna-Saldívar*, 2019; *Iqbal et al.*, 2006). Aminokiseline arginin i leucin su bile sledeće po zastupljenosti, što je uobičajeno kod proteina mahunarki (*Osemwota et al.*, 2021).

Tabela 8. Aminokiselinski sastav proteinskih izolata leblebije dobijenih iz alkalne i enzimima potpomognutih alkalnih ekstrakcija

Sadržaj (g/100 g _{SM})	ALK-izolat	ARA-izolat	(X+C)-izolat
Asparaginska kiselina	7,41±0,02 ^a	7,23±0,09 ^{ab}	7,11±0,02 ^b
Treonin	2,59±0,08 ^b	2,58±0,00 ^b	3,07±0,04 ^a
Serin	3,32±0,04 ^a	3,32±0,00 ^a	3,34±0,01 ^a
Glutaminska kiselina	11,91±0,01 ^a	11,53±0,06 ^b	11,05±0,01 ^c
Prolin	2,12±0,04 ^a	2,16±0,07 ^a	2,09±0,01 ^a
Glicin	2,96±0,01 ^a	2,89±0,04 ^a	3,00±0,02 ^a
Alanin	3,27±0,10 ^a	3,09±0,03 ^a	3,18±0,00 ^a
Cistein	0,99±0,02 ^a	0,92±0,08 ^a	0,88±0,02 ^a
Valin	3,46±0,01 ^a	3,38±0,00 ^b	3,35±0,00 ^b
Metionin	1,21±0,00 ^a	1,27±0,10 ^a	1,14±0,02 ^a
Izoleucin	3,94±0,01 ^a	3,95±0,09 ^a	3,72±0,04 ^a
Leucin	4,86±0,01 ^{ab}	4,91±0,09 ^a	4,61±0,02 ^b
Tirozin	2,94±0,00 ^b	3,35±0,04 ^a	3,28±0,05 ^a
Fenilalanin	3,78±0,13 ^a	4,03±0,07 ^a	4,09±0,17 ^a
Histidin	2,30±0,00 ^b	2,47±0,02 ^a	2,24±0,00 ^c
Triptofan	0,87±0,01 ^a	0,77±0,00 ^b	0,88±0,00 ^a
Lizin	4,83±0,01 ^a	4,68±0,06 ^a	4,21±0,04 ^b
Arginin	7,32±0,01 ^a	7,58±0,12 ^a	6,70±0,02 ^b
Ukupan sadržaj	70,12±0,12 ^a	70,15±0,24 ^a	67,98±0,10 ^b

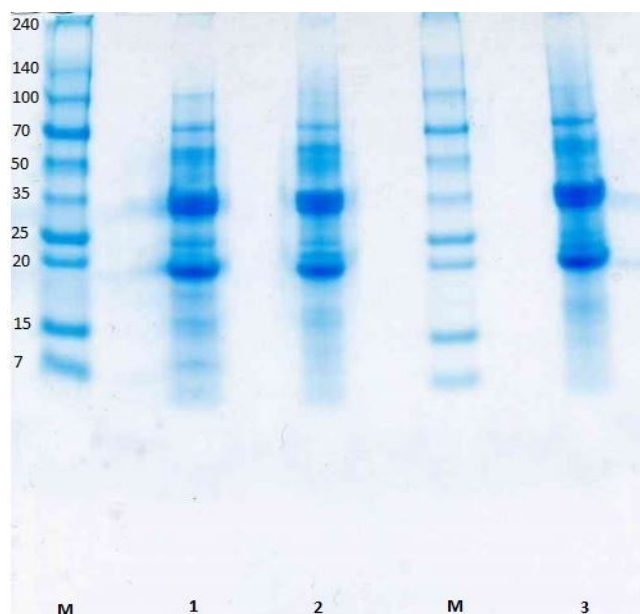
Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema *Tukey*-ovom testu na nivou $p < 0,05$

Zbirna vrednost sadržaja aminokiselina koje sadrže sumpor (metionin i cistein) pokazala se kao vrlo niska u svim dobijenim izolatima (~2 g/100 g), što je u skladu sa postojećim saznanjima. Poznato je, naime, da su ove aminokiseline limitirajuće aminokiseline u proteinu leblebije (*Singh et al.*, 1988). U niskim koncentracijama bile su prisutne takođe i aminokiseline triptofan, histidin i prolin. Dobijeni rezultati aminokiselinskog sastava alkalnog proteinskog izolata su u saglasnosti sa prethodno objavljenim istraživanjima za proteinske izolate dobijene jednakim postupkom (*Paredes-*

Lopez et al., 1991; Sánchez-Vioque et al., 1999). Enzimski tretman doveo je do veoma značajnog ($p < 0,01$) povećanja sadržaja tirozina i smanjenja sadržaja glutaminske kiseline i valina u enzimski ekstrahovanim proteinskim izolatima u odnosu na alkalni izolat. Na osnovu razlika u aminokiselinskom sastavu može se zaključiti da su postojale razlike u proteinskom sastavu dobijenih izolata, na koje je i ukazala FTIR analiza.

4.1.6. SDS poliakrilamidna gel elektroforeza proteinskih izolata leblebije

Izolati iz alkalne, kao i iz enzimima potpomognutih alkalnih ekstrakcija podvrgnuti su elektroforezi sa ciljem uvida u njihov proteinski profil. Dobijeni elektroforetogram prikazan je na slici 9 a molekulske mase date su uporedo sa stazom M u kojoj su razdvojeni standardi proteina.



Slika 9. Proteinski profili standarda (staza M), ALK-izolata (staza 1), (X+C)-izolata (staza 2) i ARA-izolata (staza 3) leblebije dobijeni SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom; u staze sa proteinskim izolatima uneto je po 20 μ g proteina

Sa dobijenog elektroforetograma može se zaključiti da su izolati pokazali sličan elektroforetski profil, sa izuzecima u nekim proteinskim trakama. U sva tri proteinska izolata najizraženije proteinske trake bile su one na ~ 22 kDa i $\sim 32 - 35$ kDa, koje se mogu pripisati α - i β -podjedinicama globulina tipa legumina, kao dominantne proteinske frakcije proteina leblebije (Singh and Jambunathan, 1982). U poređenju sa izolatom iz alkalne ekstrakcije čije su proteinske trake bile u rasponu od ~ 10 kDa do ~ 100 kDa, molekulske mase proteinskih traka u izolatima iz enzimima potpomognutih ekstrakcija kretale su se u opsegu od ~ 15 kDa do ~ 70 kDa. Odsustvo proteinskih traka na ~ 10 kDa i ~ 100 kDa u uzorcima ekstrahovanim uz pomoć enzima može biti posledica njihovog manjeg udela u ovim izolatima (s obzirom na granicu detekcije primenjene procedure bojenja i činjenicu da je uneta jednaka masa svih proteinskih izolata). Proteinska traka na elektroforetogramu na ~ 10 kDa se može pripisati 10 kDa podjedinici 2S albumina (Chang, 2006), a ona na ~ 100 kDa lipoksigenazi čija je molekulska masa 96 – 97 kDa (Sanz et al., 1992).

Sa druge strane, u izolatima dobijenim nakon ekstrakcija potpomognutim enzimima, proteinska traka na ~55 kDa bila je izraženija u poređenju sa izolatom iz alkalne ekstrakcije; ova traka se može pripisati jednoj od podjedinica glutelina, čija je molekulska masa 55 kDa (Chang, 2006). Njeno izraženije prisustvo se može objasniti poboljšanim oslobađanjem glutelinske frakcije iz kotiledona i omotača semena leblebije omogućenim primenom enzima. Naime, glutelin čini 18,1% proteina celog semena leblebije i dominantna je proteinska frakcija u omotaču semena (33,2%), dok u kotiledonima i embrionu približno 20% proteina pripada glutelinu (Singh and Jambunathan, 1982). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je hidroliza strukturnih polisaharida u semenu leblebije pomoću kombinacije celulaza i ksilanaze, kao i individualnom arabinofuranozidazom, pored ostalih, doprinela i povećanom prisustvu glutelinske frakcije u dobijenim proteinskim izolatima.

4.1.7. Funkcionalne osobine proteinskih izolata leblebije

Funkcionalna svojstva proteina predstavljaju izuzetno važnu osobinu koja u najvećoj meri određuju njihovo ponašanje i ulogu u prehranbenim sistemima. Funkcionalna svojstva tri pripremljena proteinska izolata određena su u cilju sagledavanja mogućeg uticaja enzimskih pretretmana, što bi moglo da bude značajno za njihovu upotrebu u prehranbenom matriksu.

4.1.7.1. Rastvorljivost

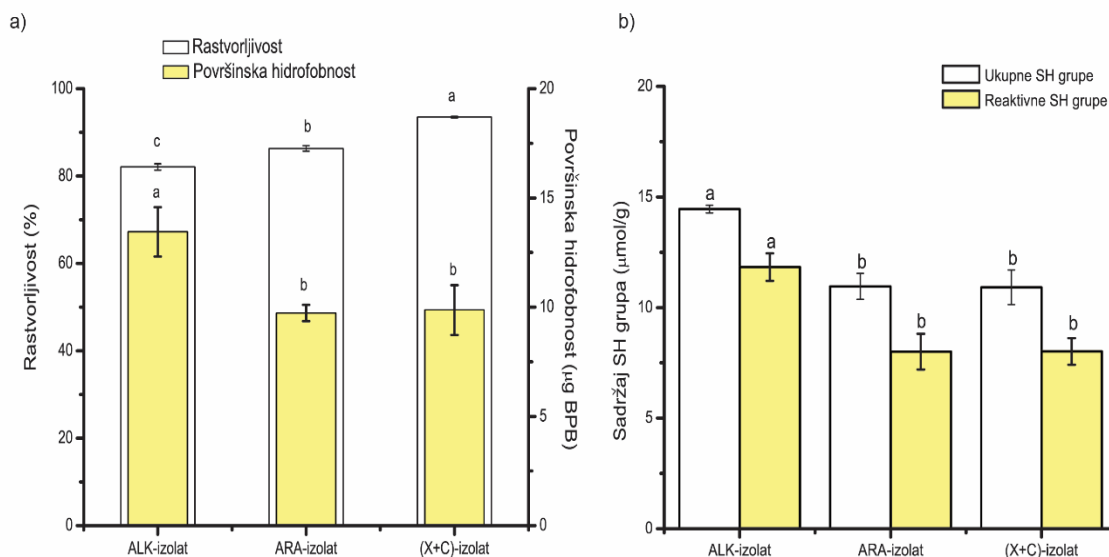
Visoka rastvorljivost proteina olakšava njihovu inkorporaciju u prehranbene sisteme i omogućava visoku funkcionalnost u primenama gde su potrebni procesi geliranja, emulgovanja i penjenja. Dobijeni rezultati pokazali su značajnu razliku u rastvorljivosti proteinskih izolata sa zaključkom da je veća rastvorljivost bila svojstvo izolata pripremljenih iz alkalnih ekstrakcija kojima je prethodio enzimski tretman (slika 10a).

Uočeno je da (X+C)-izolat posedovao najveću rastvorljivost od 93%, dok je ARA- i ALK-izolate karakterisala slabija rastvorljivost od 86% i 83%, redom. Primena individualne arabinofuranozidaze, i kombinacije celulaza i ksilanaze u tretmanima koje su prethodili alkalnoj ekstrakciji povećala je rastvorljivost proteinskih izolata za 5%, odnosno za 14%, redom, u poređenju sa izolatom iz alkalne ekstrakcije. Treba napomenuti da je rastvorljivost alkalnog izolata bila veća nego što je objavljeno za proteinski izolat leblebije, pripremljen uz pomoć alkalne ekstrakcije i izolektrične precipitacije, pri jednakim uslovima u pogledu pH i koncentracije proteina (Boye *et al.*, 2010b).

Poznato je da na rastvorljivost proteina najviše utiču aminokiselinski sastav, svojstva površine molekula proteina koja zavise od sadržaja polarnih i nepolarnih grupa, kao i sama konformacija proteinskog molekula (Zayas, 1997). Povećana rastvorljivost proteinskih izolata iz enzimima potpomognutih ekstrakcija može biti posledica razlika u sastavu proteinskih izolata, odnosno razlika u udelima ekstrahovanih proteinskih frakcija, kao rezultat enzimskog pretretmana leblebije.

Ovakva zapažanja o različitom sastavu proteinskih izolata u pogledu sadržaja proteinskih frakcija u dobroj su saglasnosti sa dobijenim rezultatima elektroforeze (slika 9). Poznato je, takođe, da se frakcije albumina, globulina i glutelina leblebije razlikuju prvenstveno po aminokiselinskom sastavu ali i po sadržaju hidrofobnih i hidrofilnih grupa (Singh and Jambunathan, 1982). Relativno veći sadržaj hidrofobnih aminokiselina (alanin, valin, glicin, prolin, leucin, izoleucin, metionin, fenilalanin i triptofan) u alkalnom izolat (tabela 8) i njegova povećana površinska hidrofobnost

(slika 10a) u odnosu na izolate iz enzima potpomognutih ekstrakcija su mogli ometati interakciju sa molekulima vode, pa samim tim i rezultirati nižom rastvorljivošću ovog proteinskog izolata. I obrnuto, niža izmerena hidrofobnost kod enzimski pretretiranih izolata u poređenju sa alkalnim (slika 10a) je mogla da bude uzrok njihove veće rastvorljivosti.



Slika 10. Rastvorljivost, površinska hidrofobnost i sadržaji ukupnih i reaktivnih sulfhidrilnih grupa kod ALK-, ARA- i (X+C)-izolata leblebije; različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema *Tukey*-ovom testu na nivou $p < 0,05$

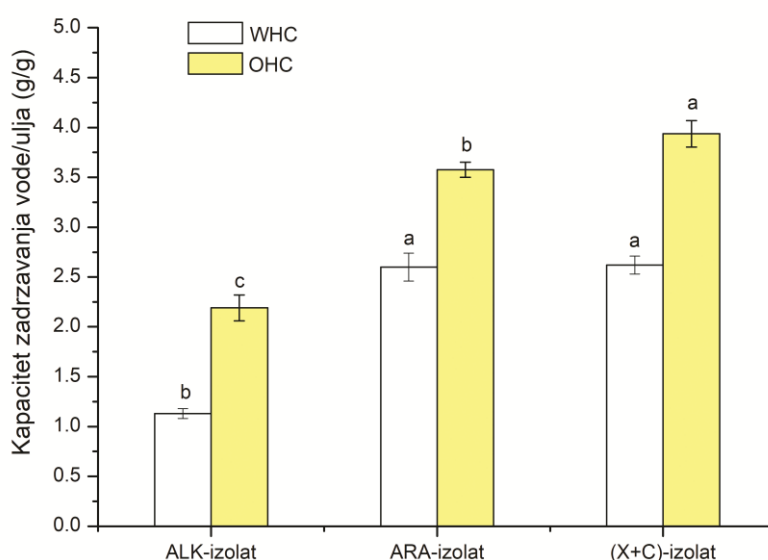
Analiza ukupnih SH grupa je pokazala da je najveći sadržaj bio u izolatu iz alkalne ekstrakcije (slika 10b), što je bilo u skladu sa najvećim sadržajem cisteina u ovom izolatu (tabela 8). S druge strane, poznato je da je gubitak native konformacije proteina povezan sa povećanjem izloženosti SH grupa na površini molekula, odnosno s povećanjem sadržaja reaktivnih sulfhidrilnih grupa (Zhang *et al.*, 2017). S tim u vezi a na osnovu rezultata (slika 10b) se može konstatovati da je odnos između sadržaja reaktivnih i ukupnih sulfhidrilnih grupa kod svih izolata bio gotovo identičan (oko 75%). Ovo je predstavljalo posredan pokazatelj da se stepen eventualne denaturacije proteina među izolatima nije razlikovao, što se može objasniti jednakim uslovima kojima su protein bili izloženi tokom alkalne ekstrakcije i alkalne faze ekstrakcije u enzimski potpomognutom protokolu. Prema tome, razlika u rastvorljivosti između ALK-izolata, s jedne, i ARA-izolata i (X+C)-izolata, s druge strane, se ne može pripisati razlikama u stepenu denaturacije, već, prvenstveno razlikama u sastavu izolata, odnosno u sadržaju hidrofobnih aminokiselina čije su bočne grupe tokom denaturacije postale izloženije, što je dovelo do razlika u površinskoj hidrofobnosti i, sledstveno, rastvorljivosti.

Slični efekti enzimskog tretmana dobijeni su za proteinske izolate soje – prema rezultatima (Perović *et al.*, 2020), ekstrakcija potpomognuta koktelom celulaza, ksilanaze i pektinaza veoma značajno je povećala rastvorljivost izolata (80%) u poređenju sa onim iz alkalne ekstrakcije (73%). Treba takođe istaći da je rastvorljivost proteina leblebije bila superiornija u poređenju sa rezultatima

dobijenim za proteine soje, što bi moglo biti od interesa jer je soja glavni konkurent leblebiji sa aspekta sirovine za dobijanje proteinskih izolata (Boye *et al.*, 2010b).

4.1.7.2. Kapaciteti zadržavanja vode i ulja

Kapaciteti zadržavanja vode (WHC) povezan je sa sposobnošću proteina da zadržava vodu (vezana voda, hidrodinamička voda, kapilarna voda i fizički zarobljena voda), i u najvećoj meri je određen karakteristikama samog molekula proteina, ali i faktorima koji potiču od medijuma u kom se protein nalazi (Moure *et al.*, 2006). Poznato je da na kapacitet zadržavanja vode najviše utiče koncentracija proteina, pH vrednost medijuma, jonska jačina, prisustvo drugih komponenata, kao što su hidrofilni polisaharidi, lipidi i soli, ali i temperatura i uslovi skladištenja (Zayas, 1997). Rezultati ispitivanja ove funkcionalne osobine pripremljenih proteinskih izolata su pokazali da je kapacitet zadržavanja vode onih iz enzimima potpomognutih alkalnih ekstrakcija bio značajno veći od WHC izolata iz alkalne ekstrakcije (slika 11).



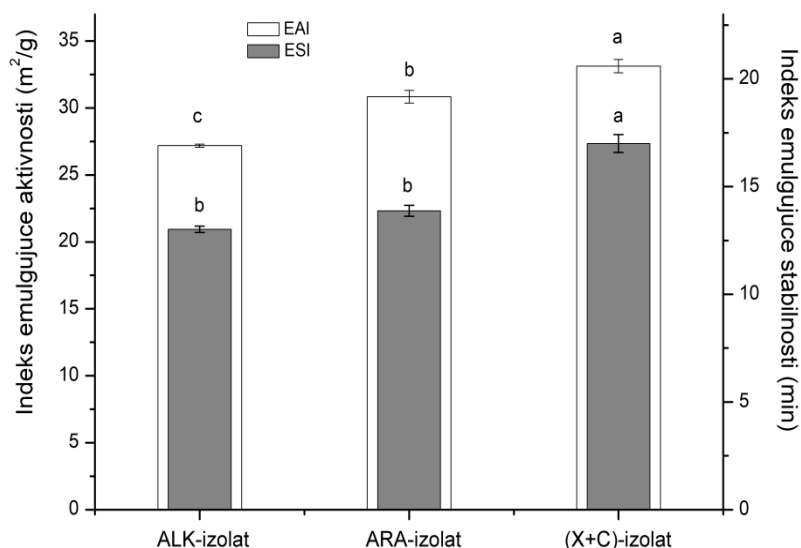
Slika 11. Kapaciteti zadržavanja vode (WHC) i ulja (OHC) proteinskih izolata iz alkalne i enzimima potpomognutih alkalnih ekstrakcija leblebije; različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema *Tukey*-ovom testu na nivou $p < 0,05$.

Razlike u kapacitetu zadržavanja vode mogu proisticati iz razlika u sastavu proteinskih izolata, odnosno iz odnosa između proteinskih frakcija u njima, koje ispoljavaju različite funkcionalne osobine. Na primer, ranije je pokazano da glutelinska frakcija indijskog oraha ima superiorniji WHC u poređenju sa drugim proteinskim frakcijama iz ove sirovine, zbog svoje fleksibilne mikrostrukture koja poboljšava interakciju sa vodom (Liu *et al.*, 2018). Dakle, veće vrednosti WHC za ARA- i (X+C)-izolat mogu biti povezane sa povećanim prisustvom glutelinske frakcije u njima, koja je efikasnije ekstrahovana nakon tretmana enzimima. Pored toga, rezultati većeg WHC proteinskih izolata iz ekstrakcija potpomognutih enzimima u poređenju sa rezultatima samo alkalne ekstrakcije su u skladu sa rezultatima njihove poboljšane rastvorljivosti.

Kapacitet zadržavanja ulja (OHC) je još jedno funkcionalno svojstvo proteina od suštinskog značaja za kvalitet prehrambenih proizvoda, njihov rok trajanja i prihvatljivost od strane potrošača. Sva tri proteinska izolata pokazala su dobru sposobnost zadržavanja ulja (slika 11), a rezultat kapaciteta zadržavanja alkalnog izolata je bio uporediv sa onima koji su ranije prijavljeni u literaturi, bez obzira da li je polazna sirovina leblebija (*Paredes-Lopez et al.*, 1991) ili druge mahunarke (*Boye et al.*, 2010b). Enzimski tretmani arabinofuranozidazom i kombinacijom celulaze i ksilanaze, koji su prethodili alkalnoj ekstrakciji, veoma značajno ($p < 0,01$) su povećali sposobnost proteinskih izolata da zadrže ulje. Ovakav rezultat može biti objašnjen zaključcima ranijih istraživanja koja su pokazala da razlike u kapacitetu zadržavanja ulja mogu biti posledica razlika u sastavu proteinskih izolata i samih uslova ekstrakcionog procesa (*Boye et al.*, 2010b; *Paredes-Lopez et al.*, 1991), ali takođe i razlika u strukturnim karakteristikama proteinskih frakcija (*Liu et al.*, 2018). Stoga se može zaključiti da su enzimima potpomognute ekstrakcije proteina iz leblebije omogućile dobijanje izolata koji su se razlikovali u sadržaju proteinskih frakcija, što se, opet, odrazilo na razlike u kapacitetu zadržavanja ulja.

4.1.7.3. Emulgujuća svojstva i penjenje

Svojstva emulgovanja i penjenja kod proteina odnose se na njihovu sposobnost da smanje površinski napon između dve faze i na taj način olakšaju formiranje stabilnog međupovršinskog sloja na granici faza ulje/voda, odnosno vazduh/voda. Rezultati emulgujućih karakteristika (indeksa emulgujuće aktivnosti i stabilnosti) proteinskih izolata dobijenih alkalnom ekstrakcijom sa ili bez upotrebe enzima prikazani su na slici 12.

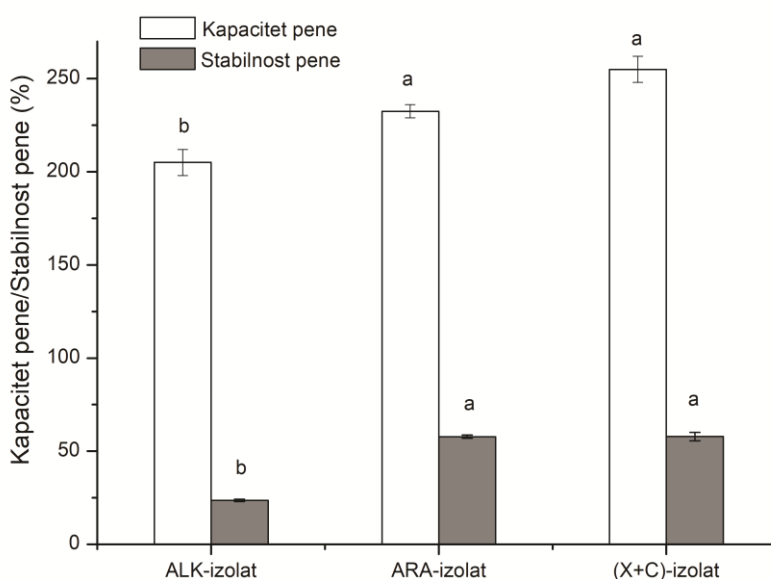


Slika 12. Indeks emulgujuće aktivnosti (EAI) i stabilnosti (ESI) ALK-, ARA- i (X+C)-proteinskih izolata leblebije; različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema *Tukey*-ovom testu na nivou $p < 0,05$.

Enzimski pretretmani individualnom arabinofuranozidazom i kombinacijom celulaza i ksilanaze, koji su prethodili alkalnoj ekstrakciji, proizveli su proteinske izolate sa veoma značajno ($p < 0,01$) povećanom emulgujućom aktivnošću u poređenju sa onim dobijenim alkalnom

ekstrakcijom. Najveću emulgujuću aktivnost pokazao je (X+C)-izolat (33 m²/g) a zatim su ga sledili ARA- i ALK-izolat (31 i 27 m²/g, redom). Poznato je da je površinska aktivnost proteina složena funkcija njihove konformacije, sposobnosti da se odvijaju na međufaznoj granici i određenih faktora kao što su fleksibilnost, prisustvo hidrofilnih i hidrofobnih ostataka u primarnoj strukturi, kao i faktora medijuma (Moure *et al.*, 2006). Pored toga, rastvorljivost proteina u vodenoj sredini je blisko povezana sa njegovom površinskom aktivnošću (Kinsella, 1979). Superiornije emulgujuće karakteristike proteinskih izolata iz enzimski potpomognutih alkalnih ekstrakcija su u dobroj saglasnosti sa rezultatima njihove veće rastvorljivosti u poređenju sa ALK-izolatom (slika 10a). Kada je reč o stabilnosti pripremljenih emulzija, najstabilnija je bila ona pripremljena sa (X+C)-izolatom. Pored toga, rezultati indeksa emulgujuće aktivnosti i indeksa stabilnosti kod svih dobijenih proteinskih izolata bili su veći ili jednaki u poređenju sa onim iz leblebije i drugih mahunarki koje su objavili Boye *et al.* (2010).

Slično kao kod emulgujućih svojstava, svojstva penjenja proteinskih izolata iz alkalnih ekstrakcija potpomognutih enzima su bila značajno poboljšana u poređenju sa onim alkalnog izolata (slika 13). Proteini ekstrahovani nakon pretretmana arabinofuranozidazom, kao i kombinacijom ksilanaze i celulaza pokazali su povećan kapacitet pene za 13% i 24%, redom, u odnosu na alkalni izolat. Stabilnost pene proteinskih izolata dobijenih iz obe enzima potpomognute ekstrakcije bila je povećana za približno 150% u odnosu na onu dobijenu sa alkalnim izolatom.



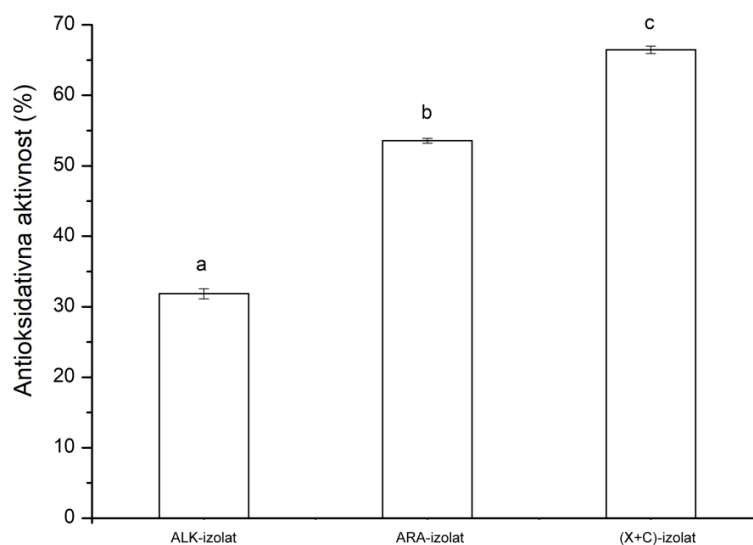
Slika 13. Kapacitet pene i stabilnost pene proteinskih izolata iz alkalne i enzimima potpomognutih alkalnih ekstrakcije leblebije; različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema Tukey-ovom testu na nivou $p < 0,05$.

Dobijeni rezultati se mogu objasniti činjenicom da se proteinske frakcije, prisutne u proteinskim izolatima u različitim odnosima, razlikuju po sposobnosti formiranja emulzija i stvaranja pene. Tako je npr. dokazano da su svojstva emulgovanja albumina i svojstva penjenja glutelina superiornija u odnosu na ove osobine ostalih proteinskih frakcija indijskog oraha (Liu *et al.*, 2018). Takođe treba imati u vidu da površinska aktivnost proteinskih izolata predstavlja složenu a ne

jednostavnu zbirnu funkciju pojedinačnih svojstava proteinskih frakcija jer je pokazano da funkcionalna svojstva proteinskih izolata mogu biti bolja od zbirnih svojstava pojedinačnih frakcija (Liu *et al.*, 2018).

4.1.8. *In vitro* antioksidativna aktivnost proteinskih izolata leblebije

Osim osobine da poboljšaju funkcionalna svojstva prehrambenih proizvoda, proteini takođe imaju veliki potencijal kao antioksidanti jer poseduju sposobnost da uklone slobodne radikale različitim mehanizmima (Elias *et al.*, 2008). Proteinski izolati dobijeni nakon alkalne ekstrakcije sa i bez enzimskog pretretmana su analizirani ABTS metodom u cilju određivanja njihove *in vitro* antioksidativne aktivnosti, i rezultati su prikazani na slici 14.



Slika 14. *In vitro* antioksidativna aktivnost ALK-, ARA- i (X+C)-proteinskog izolata određena ABTS metodom; različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema Tukey-ovom testu na nivou $p < 0,05$.

Rezultati su pokazali da je enzimski pretretman veoma značajno povećao antioksidativni potencijal alkalnog proteinskog izolata tj. njegovu sposobnost da ukloni ABTS radikale. Pretretman arabinofuranozidazom i onaj kombinacijom celulaza i ksilanaze poboljšao je antioksidativnu aktivnost alkalnog izolata za 70%, odnosno za više od 100%, redom. Dobijeni rezultati se mogu pripisati poboljšanoj ekstrakciji proteina ne samo iz kotiledona, već i iz omotača semena leblebije, što je kao posledicu imalo razliku u odnosima proteinskih frakcija u dobijenim izolatima koja bi mogla biti uzrok njihove različite antioksidativne aktivnosti. Naime, pokazano je da su proteinske frakcije albumina, globulina i glutelina, ekstrahovane iz kokosa imale različite antioksidativne aktivnosti, koje su proistekle iz njihovog različitog aminokiselinskog sastava, pri čemu je frakcija glutelina pokazala superiorniju sposobnost uklanjanja ABTS radikala u odnosu na druge dve (Li *et al.*, 2018). Ovi zaključci su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za antioksidativne aktivnosti proteinskih izolata iz alkalnih ekstrakcija leblebije potpomognutim enzimima. Poboljšana antioksidativna aktivnost ovih proteinskih izolata, dakle, može se pripisati povećanom sadržaju glutelinske frakcije u njima, u odnosu na ALK-izolat.

4.2. Nanočestice pripremljene iz proteinskih izolata leblebije

Za pripremu proteinskih nanočestica korišćeni su izolati dobijeni iz alkalne i enzimima-potpomognutih alkalnih ekstrakcija. Ispitivan je uticaj varijabli - vremena zagrevanja (10 i 20 min), pH (7 i 9,3), temperature (65 i 90 °C), koncentracije proteina (0,1 i 0,4 %) i tretmana (termički i ultrazvučni) na najvažnije karakteristike i svojstva proteinskih nanočestica – njihovu veličinu, stabilnost tokom skladištenja i hidrofobnost, kao i mutnoću nastalih disperzija. Pored toga, analizirani su kapaciteti vezivanja hidrofilnih supstanci, na primeru askorbinske kiseline, i hidrofobnih supstanci, na primeru linolne kiseline. Određena je i *in vitro* antioksidativna aktivnost pripremljenih nanočestica. Sve analizirane osobine sagledane su sa aspekta razlika u svojstvima proteinskih izolata iz primenjenih ekstrakcionih protokola.

Dobijeni rezultati su pokazali da nije bilo značajnih promena u mutnoći i veličini čestica tretiranih proteinskih rastvora u odnosu na nativne kada su primenjeni termički tretman na 65 °C i ultrazvučni tretman, kao i kada je korišćena niža koncentracija proteina od 0,1% (rezultati nisu prikazani). Shodno tome, dalje analize su izvođene pripremanjem proteinskih nanočestica termičkim tretmanom rastvora proteinskih izolata koncentracije 0,4% na 90 °C u trajanju od 10 i 20 min, na različitim pH (7 i 9,3).

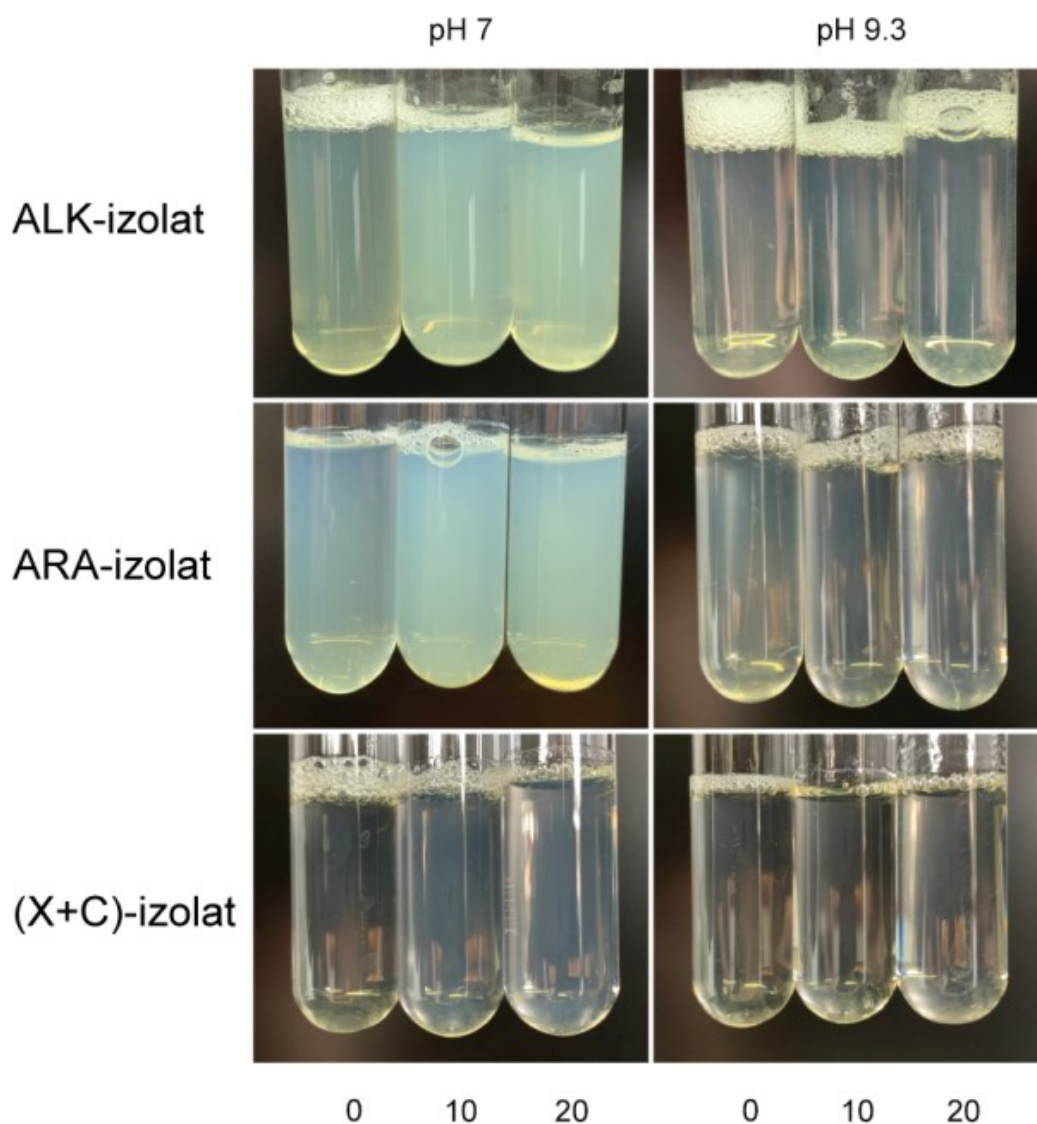
4.2.1. Mutnoća disperzije proteinskih nanočestica

S obzirom da pH igra ključnu ulogu u procesu stvaranja proteinskih nanočestica (*Wang et al.*, 2010a), mutnoća proteinskih disperzija je merena nakon termičke obrade na dve različite pH vrednosti - 7 i 9,3. Ove dve vrednosti pH izabrane su kao jedna relativno bliska, a druga udaljenija od izoelektrične tačke (pI 4,5) proteina leblebije (*Chang et al.*, 2012). Nakon preliminarnih ispitivanja, termički tretman je rađen na 90 °C što, prema literaturnim podacima predstavlja temperaturu denaturacije proteina leblebije (*Withana-Gamage et al.*, 2011). Vizuelni prikaz i vrednosti mutnoće proteinskih disperzija zagrevanih na 90 °C tokom 10 i 20 min, na pH 7 i 9,3 prikazani su na slici 15 i u tabeli 9. Rezultati su pokazali da je, kada su rastvori proteina podvrgnuti termičkom tretmanu, pH vrednost uticala na promene u mutnoći proteinskih disperzija. Nativni proteinski rastvori koji nisu bili izloženi zagrevanju su bili blago zamućeni pri pH 7 i bistri na pH 9,3.

Tabela 9. Mutnoća disperzija ALK-, ARA- i (X+C)-izolata leblebije u vodi

	Mutnoća (A_{400})		
	ALK-izolat	ARA-izolat	(X+C)-izolat
pH 7	0,35±0,05 ^b	0,49±0,00 ^b	0,25±0,01 ^b
pH 7, 10 min, 90 °C	0,80±0,01 ^a	0,93±0,01 ^a	0,39±0,00 ^a
pH 7, 20 min, 90 °C	0,86±0,00 ^a	0,92±0,01 ^a	0,39±0,00 ^a
pH 9,3	0,19±0,01 ^b	0,16±0,01 ^c	0,21±0,00 ^b
pH 9,3, 10 min, 90 °C	0,25±0,00 ^a	0,29±0,00 ^a	0,23±0,01 ^a
pH 9,3, 20 min, 90 °C	0,24±0,01 ^a	0,24±0,00 ^b	0,24±0,00 ^a

Uslovi termičkog tretmana: 90 °C tokom 10 i 20 min na pH 7 i 9,3. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (n = 3). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema *Tukey*-ovom testu na nivou $p < 0,05$.



Slika 15. Vizuelni prikaz disperzija ALK-, ARA- i (X+C)-izolata leblebije; termički tretman: 90 °C, 10 i 20 min, pH 7 i 9,3

Povećanje zamućenja proteinskih disperzija na obe pH nakon zagrevanja objašnjava se formiranjem proteinskih agregata izazvanih toplotnim tretmanom, kao što je ranije opisano (*Bengoechea et al.*, 2011). Drugim rečima, kada se rastvori proteina zagrevaju, dolazi do denaturacije i odvijanja proteinskog molekula, što je često praćeno neposrednom agregacijom usled izlaganja hidrofobnih bočnih grupa aminokiselina i njihovog učešća u intermolekulskim hidrofobnim interakcijama (*Wang et al.*, 2010a). Najveća mutnoća zabeležena je u disperziji nanočestica dobijenih iz ARA-izolata, zatim ALK- i (X+C)-izolata pri pH 7, a isti trend mutnoće disperzije je uočen nakon termičkog tretmana na pH 9,3. Kao što se može videti sa slike 15, povećanje mutnoće disperzija je bilo izraženije pri nižoj ispitivanoj pH vrednosti, što je verovatno bilo posledica intenzivnije agregacije proteina na pH bližoj izoelektričnoj tački.

Dobro je poznato da zagrevanje proteina dovodi do promene strukture ovih molekula. Međutim, termički tretman različito utiče na različite tipove sekundarnih struktura, npr. β -ravni su sklonije termičkoj denaturaciji u odnosu na α -helikse (Wang *et al.*, 2014). Upravo u ovome može ležati razlog zašto su ispitivani izolati proteina različito reagovali na toplotni tretman. Naime, razlika u mutnoći disperzija nakon termičkog tretmana proteinskih izolata iz alkalnih i enzimski-potpomognutih alkalnih ekstrakcija može biti posledica razlika u odnosima proteinskih frakcija u njima, tj. različitim procentima α -heliksa i β -ravni/ β -zavoja u njihovim sekundarnim strukturama, kao što je prethodno i utvrđeno (tabela 7).

Svi izolati su pokazali veoma značajno povećanje mutnoće na obe vrednosti pH, uz zapažanje da je porast zamućenja bio manji pri višoj vrednosti pH. S tim u vezi, niže vrednosti mutnoće proteinskih disperzija pri višim vrednostima pH mogu biti povezane sa većim elektrostatičkim odbijanjem između proteinskih molekula ($pH \gg pI$) i, povezano sa tim, manjom agregacijom proteinskih molekula. S druge strane, iz prikazanih rezultata se može videti da produženje vremena zagrevanja nije pokazalo dalje povećanje zamućenja kod svih izolata na obe ispitivane pH vrednosti. Treba, takođe, primetiti i da su dobijeni rezultati za veću mutnoću proteinskih disperzija bili usaglašeni sa rezultatima za veličinu proteinskih nanočestica (veće nanočestice su dobijene na nižem pH) koji će biti prikazani u narednom potpoglavlju (4.2.2).

4.2.2. Raspodela veličina proteinskih nanočestica

Dobro je poznato da su veličina i indeks polidisperznosti (PdI) među najvažnijim karakteristikama pripremljenih nanočestica (Soleimanifar *et al.*, 2020). Raspodela veličina molekula proteina u netretiranim rastvorima, kao i raspodela veličina čestica (PSD) u disperzijama nakon termičkog tretmana rastvora ALK-, ARA- i (X+C)-izolata prikazane su na slici S1. Kada su rastvori proteina, nakon što je pH vrednost podešena na 7 i 9,3, podvrgnuti termičkom tretmanu, došlo je do zamućenja zbog formiranja čestica, kao posledica intenzivne agregacije proteina. Kao što je ranije objašnjeno, tokom procesa zagrevanja neke od vodoničnih veza koje stabilizuju sekundarnu strukturu proteina počinju da se kidaju, nakon čega dolazi do delimičnog „odmotavanja“ molekula proteina, što za posledicu ima izlaganje hidrofobnih bočnih grupa aminokiselina, koje favorizuje njihovu agregaciju (Juárez *et al.*, 2009). Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da je učesće β -ravni u konformacionim promenama sekundarne strukture igralo važnu ulogu i to prvenstveno u formiranju agregata. Kao što je već napomenuto, poznato je da su α -heliksi stabilniji od β -ravni tokom termičkog tretmana (Wang *et al.*, 2014). Kako su se proteinski izolati razlikovali po sadržaju elemenata sekundarne strukture (α -heliks, β -ravan/ β -zavoj), termički tretman ovih struktura u izolatima je mogao dovesti do razlika u pripremljenim proteinskim nanočesticama i njihovim veličinama.

Rezultati su pokazali da je monomodalni PSD bio prisutan u svim uzorcima (netretirani rastvori proteinskih izolata i pripremljene nanočestice) na obe vrednosti pH, sa izuzetkom bimodalnog PSD nakon 10 minuta zagrevanja na pH 7 za ALK- i ARA-izolat (slike S1a i S1b). Pojava bimodalne raspodele veličine čestica mogla bi ukazati da proces agregacije u datom vremenu nije bio potpun (Ferrado *et al.*, 2019).

Kao rezultat različitog vremena trajanja termičkog tretmana i vrednosti pH na kom su pripremane, dobijene su nanočestice različitih veličina u rasponu od 28 do 290 nm (tabela 10). Srednji prečnik čestica i mutnoća (tabela 9) su porasli tokom prvih 10 minuta zagrevanja, što ukazuje da se tokom ovog perioda dešavala intenzivna agregacija proteina. U narednih 10 minuta termičkog

tretmana i veličina čestica i mutnoća su ostali relativno konstantni, što sugerise da u ovom vremenskom okviru nije bilo važnijih promena u karakteristikama nanočestica.

Obično se raspodela veličine čestica analizira zajedno sa indeksom polidisperznosti (PdI). Izračunavanje PdI uzima u obzir srednju veličinu čestice, indeks prelamanja rastvarača, ugao merenja i varijansu distribucije (Gaumet et al., 2008). Rezultati za vrednosti indeksa polidisperznosti (PdI) su pokazali smanjenje u poređenju sa rastvorima netretiranih proteina (<0,4) što je ukazalo na umerenu polidisperznost pripremljenih proteinskih nanočestica (Li et al., 2007; Sponton et al., 2017).

Tabela 10. Parametri veličine nanočestica dobijenih termičkim tretmanom*
ALK-, ARA- i (X+C)-izolata leblebije

	Pik 1 (nm)	Pik 2 (nm)	Srednji prečnik (nm)	PdI
ALK-izolat				
pH 7	17±2	-	63±4	0,493±0,015
pH 7, 10 min, 90 °C	292±1 (51%)	110±5 (49%)	165±8	0,212±0,003
pH 7, 20 min, 90 °C	137±10	-	137±0	0,235±0,043
pH 9.3	15±1	-	53±3	0,554±0,007
pH 9.3, 10 min, 90 °C	47±1	-	121±6	0,434±0,007
pH 9.3, 20 min, 90 °C	48±1	-	82±5	0,242±0,035
ARA-izolat				
pH 7	23±0	-	138±1	0,474±0,057
pH 7, 10 min, 90 °C	251±8 (70%)	54±0 (30%)	166±5	0,228±0,025
pH 7, 20 min, 90 °C	171±2	-	149±1	0,226±0,033
pH 9.3	18±0	-	72±4	0,479±0,022
pH 9.3, 10 min, 90 °C	38±5	-	73±4	0,366±0,017
pH 9.3, 20 min, 90 °C	47±4	-	88±2	0,388±0,000
(X+C)-izolat				
pH 7	13±2	-	117±6	0,490±0,006
pH 7, 10 min, 90 °C	34±2	-	81±8	0,367±0,068
pH 7, 20 min, 90 °C	46±3	-	83±10	0,358±0,014
pH 9.3	14±0	-	59±2	0,537±0,012
pH 9.3, 10 min, 90 °C	28±1	-	65±1	0,471±0,002
pH 9.3, 20 min, 90 °C	32±3	-	65±1	0,408±0,025

* termički tretman: 90 °C, 10 i 20 min, pH 7 i 9,3

Ispitivanja efekata termičkih tretmana na strukturu proteina soje su pokazala značajno smanjenje udela β -ravni, odnosno povećanje udela α -heliksa (Wang et al., 2014). Takođe, rezultati objavljeni u radu Long et al. (2015) su ukazali da zagrevanje proteina soje u trajanju od 20 minuta na

120 °C izaziva značajno smanjenje udela β -ravni i povećanje udela α -heliksa. Štaviše, promene u sadržaju elemenata sekundarne strukture proteina (smanjenje udela β -ravni) su bile prisutne i u proteinima iz drugih izvora nakon primene termičkog tretmana (Choi and Ma, 2007; Mills et al., 2001; Wang et al., 2014; Ye et al., 2017).

Rezultati dobijeni analizom udela sekundarnih struktura u nanočesticama pripremljenim od proteinskih izolata leblebije su pokazali da je termički tretman izazvao povećanje udela struktura α -heliksa i smanjenje udela β -ravni u poređenju sa netretiranim proteinskim izolatima. Pokazano je da je tokom termičkog tretmana došlo do smanjenja sadržaja β -ravni za 13% i 18% u alkalno ekstrahovanom proteinskom izolatu, za 6 i 13% u izolatu proteina dobijenom uz pomoć arabinofuranozidaze, i za 6 i 10% u izolatu dobijenom uz pomoć celulaza i ksilanaze, pri pH 7 i pH 9,3, redom, u odnosu na odgovarajuće izolate bez tretmana (tabela 11).

Tabela 11. Udeo komponenata sekundarne strukture u proteinskim nanočesticama pripremljenim termičkim tretmanom izolata leblebije na osnovu FTIR analize

	Bez tretmana		pH 7, 10 min, 90 °C		pH 9,3, 20 min, 90 °C	
	α -helix	β -ravan	α -helix	β -ravan	α -helix	β -ravni
ALK-izolat	17	59	18	48	20	52
ARA-izolat	26	41	37	36	34	38
(X+C)-izolat	29	40	31	36	35	37

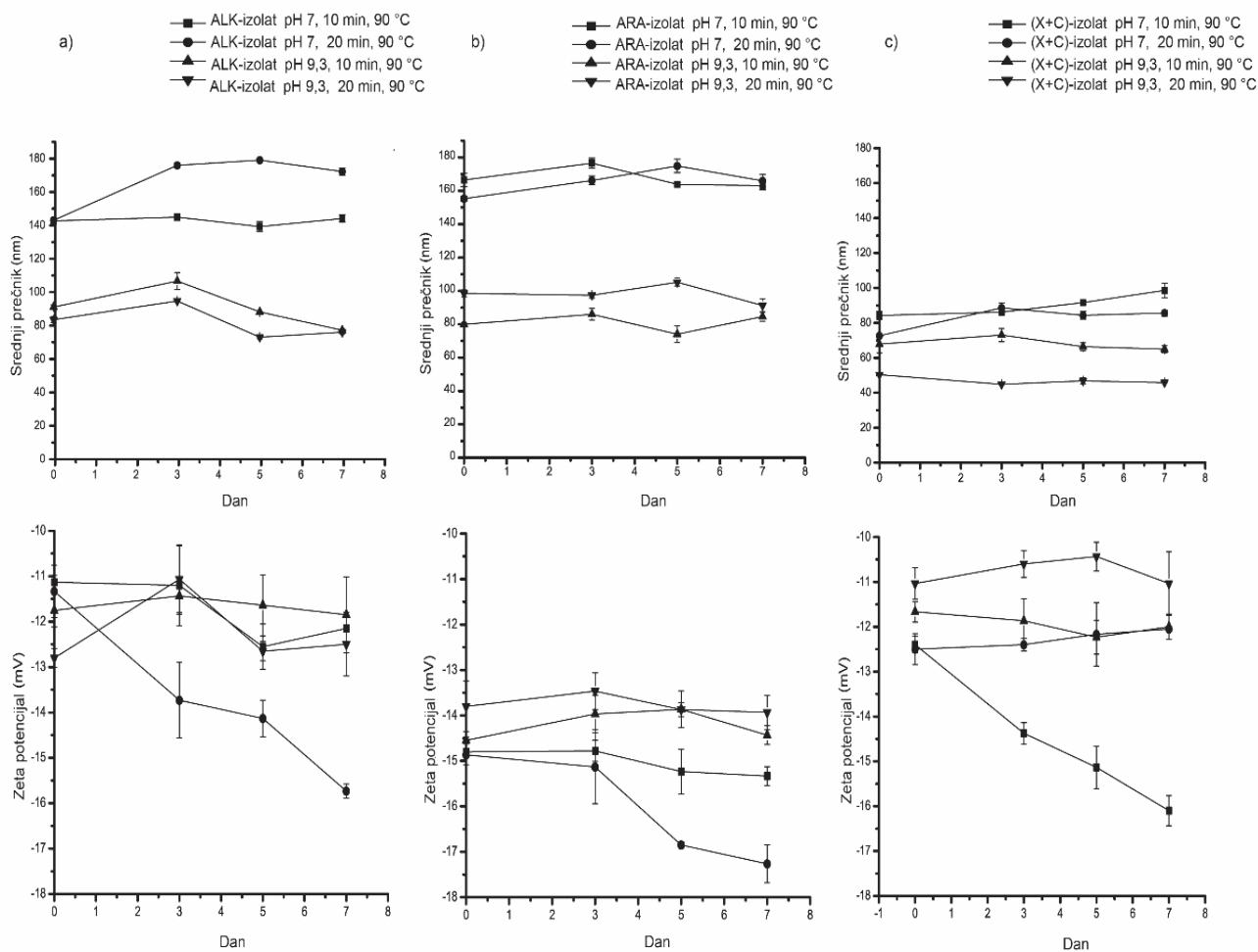
Promena udela β -ravni nakon termičkog tretmana može se povezati sa ulogom ovih sekundarnih struktura u formiranju agregata i to preko intermolekulskih interakcija polipeptidnih lanaca. Kako se β -ravni uvek nalaze u unutrašnjosti proteinskog molekula, delimični gubitak strukture β -ravni ukazuje na odvijanje strukture proteina i izlaganje hidrofobnih mesta koja mogu da interaguju jedno sa drugim i izazovu agregaciju. Može se uočiti povezanost između smanjenja udela β -ravni i veličine pripremljenih nanočestica. Nanočestice najveće veličine pripremljene su iz ALK-izolata a upravo je ovaj izolat imao najveći udeo β -ravni u svojoj sekundarnoj strukturi pre tretmana, kao i njegovo najintenzivnije smanjenje nakon tretmana. Upravo zbog toga veći prečnici pripremljenih nanočestica kod ALK-izolata su bile posledica većeg gubitka β -ravni, što je, posledično, moglo imati uticaj na intenzitet agregacije, odnosno veličinu proteinskih čestica. Proteinske nanočestice najmanjih prečnika su pripremljene od (X+C)-izolata, verovatno zbog relativno većeg udela stabilnijih α -heliksa prisutnih u njegovoj strukturi i stoga manjeg sadržaja β -ravni.

4.2.3. Stabilnost proteinskih nanočestica tokom skladištenja

Različita primena proteinskih nanočestica u prehrambenim sistemima u velikoj meri zavisi od njihove stabilnosti koja se ogleda u smanjenoj ili odsutnoj sedimentaciji ili rastvaranju tokom vremena. Da bi se ispitala stabilnost nanočestica pripremljenih od proteinskih izolata leblebije,

mereni su prosečni prečnik i zeta potencijal u periodu od 7 dana tokom skladištenja na 4 °C a dobijeni rezultati su predstavljeni na slici 16.

Pri pH 7, nakon 7 dana skladištenja na 4 °C, nanočestice pripremljene iz svih ispitivanih proteinskih izolata su pokazale povećanje srednjeg prečnika u poređenju sa nultim danom, što može ukazati na konformacione promene u njihovoj strukturi. Najveće uvećanje srednjeg prečnika od 20% zabeleženo je kod nanočestica pripremljenih od alkalnog izolata, dok su nanočestice pripremljene od izolata dobijenih uz pomoć enzima pokazale manje uvećanje tokom ispitivanog vremena skladištenja.



Slika 16. Srednji prečnik i zeta potencijal proteinskih nanočestica pripremljenih termičkim tretmanom a) AKL-izolata, b) ARA-izolata i c) (X+C)-izolata leblebije, mereni u periodu od 7 dana tokom skladištenja na 4 °C

Nanočestice pripremljene od (X+C)-izolata pokazale su povećanje srednjeg prečnika od 17%, dok su nanočestice od ARA-izolata imale najmanji porast ove veličine od 7%. Dobijeni rezultati su bili u saglasnosti sa promenama u zeta potencijalu; veoma značajno ($p < 0,01$) povećanje negativnog površinskog naelektrisanja je izmereno kod nanočestica iz ALK-izolata (dobijenim nakon 20 minuta tretmana na pH 7), ARA-izolata (nakon 20 min na pH 7) i (X+C)-izolata (nakon 10 min na pH 7)

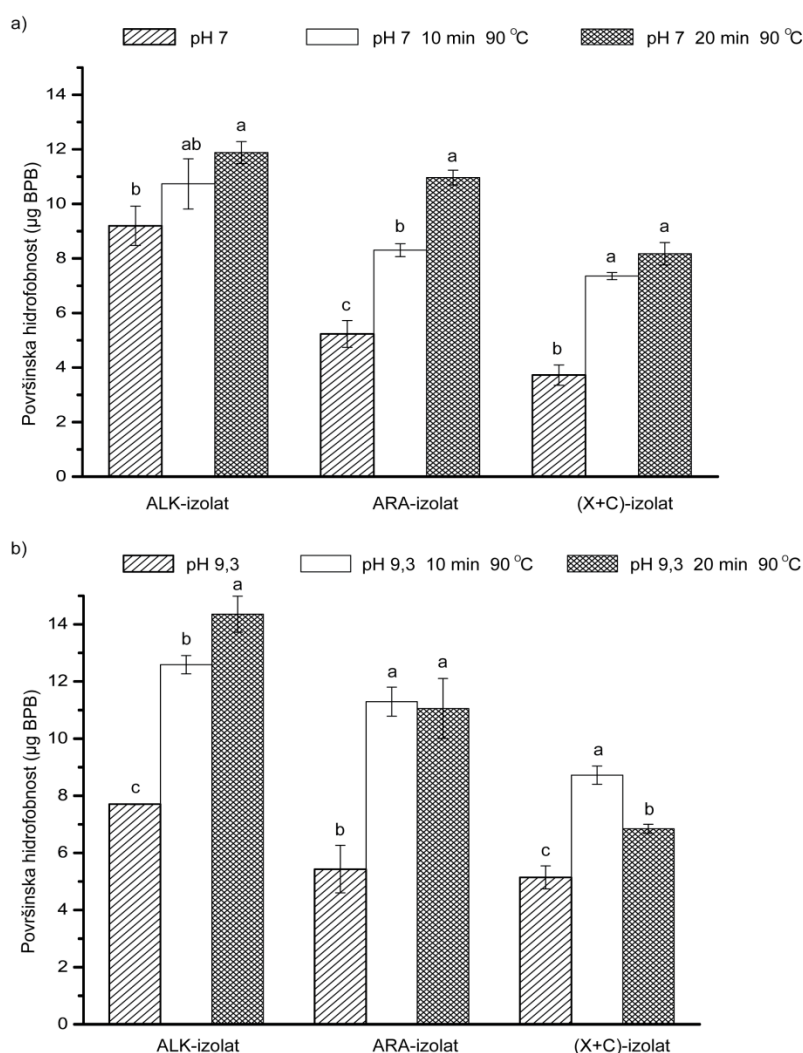
posle 7 dana skladištenja. Ovakva zapažanja mogu se objasniti promenama u strukturi proteinskih nanočestica koje su dovele do izlaganja naelektrisanih aminokiselina a s tim i većim vrednostima zeta potencijala, kao što je to prethodno objašnjeno (Fan et al., 2021). Na višoj pH vrednosti, 9,3, utvrđeno je veoma značajno smanjenje srednjeg prečnika (9 - 16%) za nanočestice pripremljene od alkalnog izolata ($p < 0,01$). Nanočestice dobijene iz proteinskih izolata ekstrahovanih uz pomoć arabinofuranozidaze, i kombinacije celulaza i ksilanaze nisu pokazale značajnu ($p > 0,05$) promenu u srednjem prečniku, potvrđujući da su ove koloidne disperzije ostale relativno stabilne u pogledu konformacionih promena, agregacije ili rastvaranja čestica, odnosno da su pokazale veću stabilnost tokom skladištenja. Pored toga, nije bilo značajne razlike ($p > 0,05$) u zeta potencijalu kod ovih nanočestica ni nakon 7 dana skladištenja (rezultati nisu prikazani).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su stabilnije nanočestice proizvedene od proteinskih izolata dobijenih iz alkalnih ekstrakcija potpomognutih enzimima nego od alkalnog izolata, i to pri višim pH vrednostima. Ovo se može dovesti u vezu sa razlikama u proteinskom sastavu izolata, odnosno udelima elemenata sekundarne strukture, nastalim kao rezultat enzimskog tretmana pre alkalne ekstrakcije. Pokazano je, takođe, da su nanočestice pripremljene od proteinskih izolata iz enzimima potpomognutih ekstrakcija bile stabilne, što predstavlja dobar preduslov za njihovu dalju upotrebu kao nanonosača različitih bioloških jedinjenja.

4.2.4. Površinska hidrofobnost proteinskih nanočestica

Poznato je da proteini poseduju širok spektar funkcionalnih grupa na svojoj površini koje im omogućavaju interakciju sa nizom različitih molekula (Fathi et al., 2018). Takođe, prisustvo hidrofobnih grupa i povećana površinska hidrofobnost molekula proteina mogu imati znatan uticaj na brojne karakteristike ovih molekula na način da se prvenstveno smanji njihova rastvorljivost, ograniči difuzivnost, olakšaju interakcije protein-protein i podstakne njihova agregacija putem stvaranja hidrofobnih interakcija. Rezultati površinske hidrofobnosti pripremljenih nanočestica prikazani su na slici 17, uporedo sa rezultatima površinske hidrofobnosti rastvora nativnih proteinskih izolata leblebije na odgovarajućim pH vrednostima.

Prikazani rezultati pokazuju da je površinska hidrofobnost nanočestica iz sva tri ispitivana izolata nakon termičkog tretmana bila veoma značajno ($p < 0,01$) povećana u poređenju sa onom netretiranih proteina. Generalno, termički tretman je prouzrokovao porast površinske hidrofobnosti što se može objasniti odvijanjem molekula proteina i izlaganjem hidrofobnih domena koji se u nativnom molekulu nalaze u unutrašnjosti (Sponton et al., 2015b). Poznato je da je površinska hidrofobnost povezana sa promenama u elementima sekundarne strukture i to β -ravni nakon termičkog tretmana; delimični gubitak strukture β -ravni tokom zagrevanja rezultira izlaganjem hidrofobnih domena, što može izazvati povećanje hidrofobnosti kod molekula proteina (Wang et al., 2014). Najveće vrednosti površinske hidrofobnosti za nanočestice pripremljene od alkalnog izolata na oba ispitivana pH mogu se objasniti najvećim sadržajem β -ravni u ovom izolatu. Razlike u rezultatima površinske hidrofobnosti pripremljenih nanočestica mogu se povezati sa različitim udelima elemenata sekundarne strukture (α -heliksa, β -ravni/ β -zavoja) u ekstrahovanim proteinskim izolatima, kao i u samim nanočesticama. Dobijeni rezultati za povećanje površinske hidrofobnosti pod uticajem termičkog tretmana su u skladu sa literaturnim navodima (Chen et al., 2019; Peng et al., 2016; Wang et al., 2019, Wang et al., 2014).

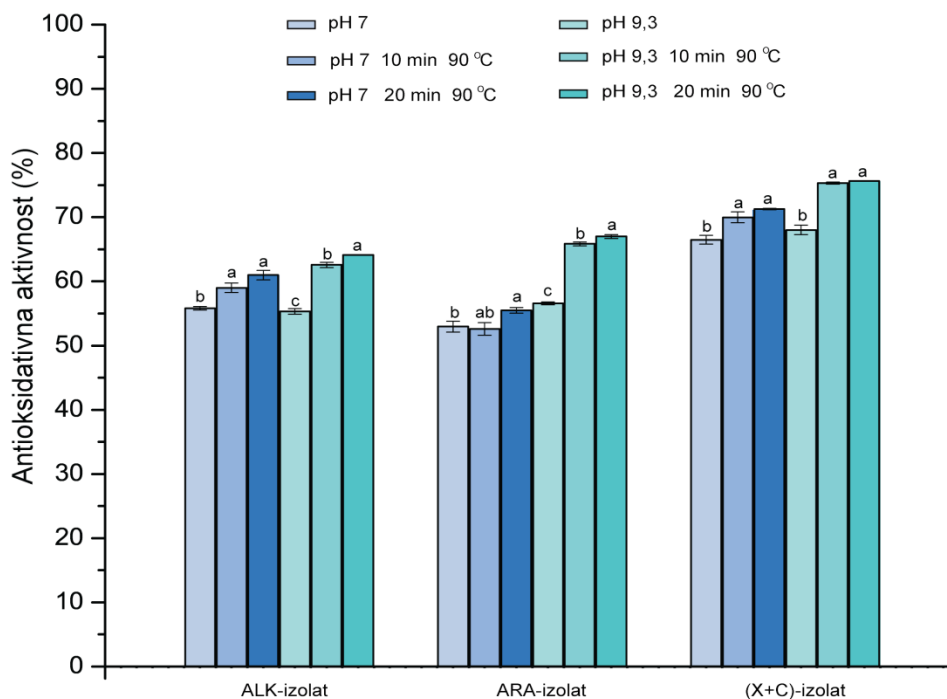


Slika 17. Površinska hidrofobnost proteinskih nanočestica pripremljenih iz ALK-, ARA- i (X+C)-izolata; termički tretman: 90 °C tokom 10 i 20 min na pH 7 i 9,3. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ($n = 3$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema *Tukey*-ovom testu na nivou $p < 0,05$.

4.2.5. *In vitro* antioksidativna aktivnost proteinskih nanočestica

Kao što je već rečeno, pored primene u raznim prehrambenim proizvodima u cilju poboljšanja njihovih nutritivnih i funkcionalnih karakteristika, proteini imaju odličan potencijal i kao antioksidanti. Zato je bilo interesantno ispitati kakav efekat termički tretman ima na ovu važnu biološku aktivnost. Rezultati antioksidativne aktivnosti pripremljenih nanočestica prikazani su na slici 18, uporedo sa antioksidativnom aktivnošću odgovarajućih proteinskih izolata iz alkalnih ekstrakcija sa ili bez enzimskog tretmana. Termički tretman doprineo je povećanju antioksidativnog potencijala svih pripremljenih nanočestica, određenog njihovom sposobnošću da uklone ABTS radikale. Nanočestice su pokazale povećanje antioksidativne aktivnosti za 5 - 9% pri pH 7, i za 11 - 18% pri pH 9,3 u poređenju sa proteinskim izolatima koji nisu bili podvrgnuti termičkom tretmanu.

Najizraženije povećanje ABTS aktivnosti od 18% izmereno je kod nanočestica dobijenih iz ARA-izolata nakon termičkog tretmana na pH 9,3 u trajanju od 20 min, što je predstavljalo visoko značajnu ($p < 0,001$) razliku u poređenju sa odgovarajućim nativnim izolatom.

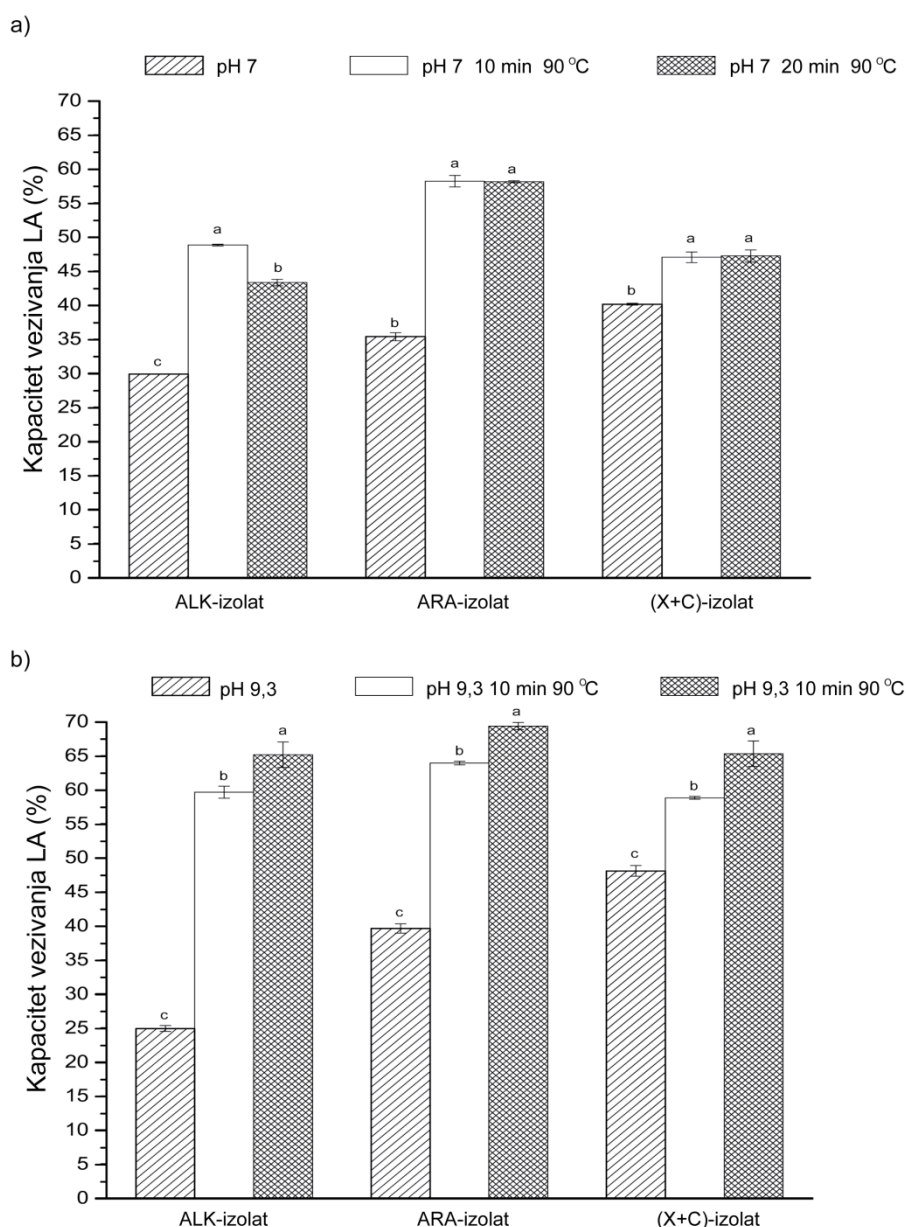


Slika 18. *In vitro* antioksidativna aktivnost proteinskih nanočestica pripremljenih iz ALK-, ARA- i (X+C)-izolata određena ABTS testom. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ($n = 3$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema Tukey-ovom testu na nivou $p < 0,05$.

Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Žilić *et al.* (2012), koji su pokazali da je termički tretman (10 min na 80 °C) proteina kukuruza povećao njegovu antioksidativnu aktivnost za 12% u poređenju sa proteinom koji nije bio podvrgnut termičkom tretmanu. Ukupna antioksidativna aktivnost proteina može se poboljšati otvaranjem njegove tercijarne strukture kako bi se povećala dostupnost rastvarača bočnim grupama aminokiselina koje mogu da uklone slobodne radikale (Elias *et al.*, 2008), čime se mogu objasniti dobijeni rezultati.

4.2.6. Kapacitet proteinskih nanočestica za vezivanja linolne kiseline

Brojni proteini imaju sposobnost da vezuju različite hidrofobne/hidrofilne bioaktivne supstance, bilo specifičnim ili nespecifičnim interakcijama, ili formiranjem kompleksa, što može biti od velikog značaja za poboljšanje njihovog inkorporiranja u hranu (Wan *et al.*, 2015). Proteinske nanočestice mogu pružiti različite mogućnosti za modifikaciju i vezivanje različitih jedinjenja. Kapacitet nanočestica pripremljenih od ALK-, ARA- i (X+C)-proteinskih izolata da vežu hidrofobne supstance analizirana je sa linolnom kiselinom (LA) i dobijeni rezultati su prikazani na slici 19, uporedo s kapacitetom odgovarajućih nativnih izolata.



Slika 19. Kapacitet proteinskih nanočestica dobijenih termičkim tretmanom ALK-, ARA- i (X+C)-izolata za vezivanje LA; termički tretman: 90 °C tokom 10 i 20 min na pH 7 i 9,3; Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ($n = 3$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema *Tukey*-ovom testu na nivou $p < 0,05$.

Nanočestice pripremljene iz sva tri izolata pokazale su veoma značajno ($p < 0,001$) povećanje kapaciteta vezivanja LA u poređenju sa termički netretiranim proteinima. Najveći kapacitet vezivanja imale su nanočestice pripremljene od ARA-izolata na obe ispitivane pH vrednosti (58% na pH 7 i 69% na pH 9,3). Povećani kapacitet vezivanja LA proteinskih nanočestica može biti povezan sa činjenicom da tokom termičkog tretmana dolazi do izlaganja hidrofobnih aminokiselina i stvaranja novih mesta za vezivanje hidrofobnih molekula. Parametri veličine čestica (površina, zapremina,

odnos površina/zapremina), kao i odnos površinska hidrofobnost/površina nanočestica određivani su sa ciljem objašnjenja uticaja procesnih uslova na parametre površinske hidrofobnosti a samim tim i na kapacitet vezivanja LA (tabela 12).

Tabela 12. Parametri veličine nanočestica* i odnos površinska hidrofobnost/površina nanočestica** pripremljenih od ALK-, ARA- i (X+C)-izolata

	A (nm ²)	V (nm ³)	A/V (1/nm)	PH/A (μg BPB/nm ²)
ALK-izolat				
pH 7, 10 min, 90 °C	$3,43 \times 10^5$	$23,66 \times 10^5$	0,14	$3,1 \times 10^{-5}$
pH 7, 20 min, 90 °C	$2,36 \times 10^5$	$13,47 \times 10^5$	0,17	$5,0 \times 10^{-5}$
pH 9,3, 10 min, 90 °C	$1,84 \times 10^5$	$9,30 \times 10^5$	0,20	$6,8 \times 10^{-5}$
pH 9,3, 20 min, 90 °C	$8,37 \times 10^4$	$2,85 \times 10^5$	0,29	$1,7 \times 10^{-4}$
ARA-izolat				
pH 7, 10 min, 90 °C	$3,48 \times 10^5$	$24,11 \times 10^5$	0,14	$2,4 \times 10^{-5}$
pH 7, 20 min, 90 °C	$2,78 \times 10^5$	$17,21 \times 10^5$	0,16	$3,9 \times 10^{-5}$
pH 9,3, 10 min, 90 °C	$6,63 \times 10^4$	$2,01 \times 10^5$	0,33	$1,7 \times 10^{-4}$
pH 9,3, 20 min, 90 °C	$9,77 \times 10^4$	$3,59 \times 10^5$	0,27	$1,1 \times 10^{-4}$
(X+C)-izolat				
pH 7, 10 min, 90 °C	$8,34 \times 10^4$	$2,83 \times 10^5$	0,29	$8,8 \times 10^{-5}$
pH 7, 20 min, 90 °C	$8,68 \times 10^4$	$3,00 \times 10^5$	0,29	$9,4 \times 10^{-5}$
pH 9,3, 10 min, 90 °C	$5,37 \times 10^4$	$1,46 \times 10^5$	0,37	$1,6 \times 10^{-4}$
pH 9,3 20 min, 90 °C	$5,36 \times 10^4$	$1,46 \times 10^5$	0,37	$1,2 \times 10^{-4}$

* površina – A ; zapremina – V ; odnos površina/zapremina - A/V ;

** odnos površinska hidrofobnost/površina nanočestica – PH/A .

Generalno, dobijeni rezultati su ukazali da se na višoj pH vrednosti stvaraju manje nanočestice (A), za koje je karakterističan veći odnos površine i zapremine (A/V). To znači da je udeo hidrofobne površine u nanočesticama manjih dimenzija veći nego kod nanočestica većih dimenzija (PH/A) (Sponton et al., 2017). Shodno tome, kod svih pripremljenih nanočestica uočeno je da se na većoj vrednosti pH termičkim tretmanom formirale manje nanočestice koje je odlikovala veća hidrofobnost a samim tim i povećan kapacitet vezivanja linolne kiseline.

Analiza uticaja vremena zagrevanja na kapacitet vezivanja LA pokazala je da je na pH 7 postignut maksimalni kapacitet nakon 10 min zagrevanja kod proteinskih nanočestica iz svih izolata, jer produžetak termičkog tretmana na 20 min nije izazvao bitnije promene. Ipak, pri pH 9,3

maksimalni kapacitet vezivanja LA je postignut nakon 20 min zagrevanja. Ovaj rezultati može se objasniti povećanjem broja mesta vezivanja LA podstaknut konformacionim promenama proteina tokom zagrevanja na višoj pH vrednosti. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima koje su pokazala da proteinske nanočestice dobijene uz pomoć termičkog tretmana imaju povećan kapacitet vezivanja linolne kiseline (Fang et al., 2015; Perez et al., 2015; Sponton et al., 2015b).

4.2.7. Kapacitet proteinskih nanočestica za vezivanja askorbinske kiseline

Askorbinska kiselina (vitamin C) predstavlja glavni antioksidant neophodan za različite biološke funkcije u organizmu jer, između ostalog, deluje i kao primarna odbrana od štetnog uticaja slobodnih radikala (Shahraki et al., 2018). Upravo zbog toga je ispitivana mogućnost vezivanja ovog vitamina za proteinske nanočestice pripremljene od ALK-, ARA- i (X+C)-proteinskih izolata. U ekperimentima su korišćene nanočestice koje su imale najveće (pH 7, 10 min, 90 °C) i najmanje (pH 9,3 10 min, 90 °C) dimenzije, kao i odgovarajući izolati u nativnom stanju. Rezultati konstanti vezivanja vitamina C od strane pripremljenih nanočestica prikazani su u tabeli 13, uporedo sa rezultatima konstanti vezivanja odgovarajućih termički netretiranih proteinskih izolata.

Iz poređenja konstanti vezivanja askorbinske kiseline od strane proteinskih izolata i odgovarajućih nanočestica pripremljenih termičkim tretmanom, može se videti da je primenjeni tretman izazvao smanjenje kapaciteta vezivanja ovog jedinjenja. Ovi rezultati se mogu objasniti činjenicom da je termički tretman proizveo proteinske nanočestice sa većom površinskom hidrofobnošću i dodatnim hidrofobnim regionima na površini molekula. Te konformacione promene u strukturi proteina mogu da dovedu do smanjenog vezivanja askorbinske kiseline verovatno zbog njene izražene hidrofilne prirode. U isto vreme, ovi rezultati su u skladu sa onim dobijenim za kapacitet vezivanja hidrofilnog molekula linolne kiseline. Iz pregleda dostupne literature može se zaključiti da do sada nisu vršena ispitivanja vezivanja askorbinske kiseline za proteinske nanočestice pripremljene upotrebom termičkog tretmana. Suprotno našim rezultatima, Voci et al. (2022) su pokazali dobro vezivanje askorbinske kiseline za nanočestice pripremljene metodom desolvatacije od glijadinske frakcije proteina pšenice.

Tabela 13. Konstanta vezivanja askorbinske kiseline od strane proteinskih nanočestica pripremljenih termičkim tretmanom ALK-, ARA- i (X+C)-izolata

	Konstanta vezivanja (l/mol)		
	ALK-izolat	ARA-izolat	(X+C)-izolat
pH 7	$6,28 \times 10^2$	$2,29 \times 10^2$	$6,37 \times 10^2$
pH 7, 10 min, 90 °C	$2,48 \times 10^2$	$2,20 \times 10^2$	$4,00 \times 10^2$
pH 9,3	$3,32 \times 10^2$	$8,43 \times 10^1$	$8,25 \times 10^2$
pH 9,3, 20 min, 90 °C	$2,32 \times 10^2$	$1,25 \times 10^2$	$1,23 \times 10^2$

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija (n = 3). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema Tukey-ovom testu na nivou $p < 0,05$.

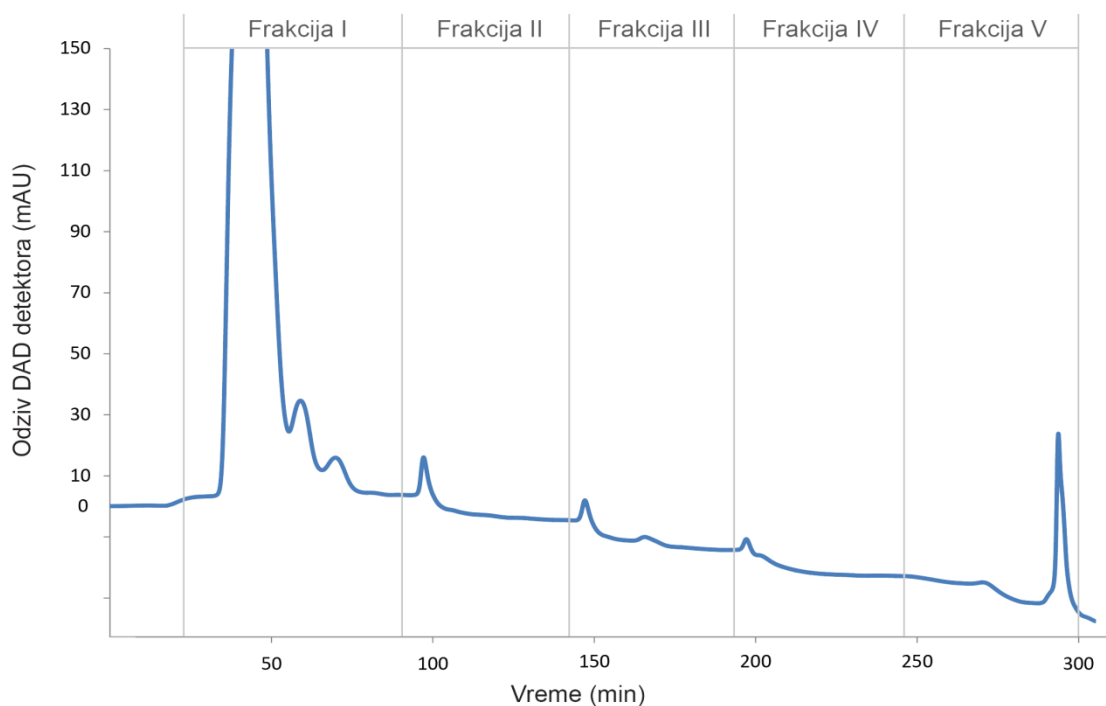
4.3. Razdvajanje proteina leblebije preparativnom hromatografijom sa hidrofobnim interakcijama

Razdvajanje proteina leblebije urađeno je preparativnom hromatografijom sa hidrofobnim interakcijama a dobijene frakcije, eluirane sa kolone u gradijentnim koracima, su analizirane u pogledu sastava proteina i udela elemenata sekundarne strukture, kao i *in vitro* antioksidativne aktivnosti. Izabran je proteinski izolat iz alkalne ekstrakcije potpomognute arabinofuranozidazom, kao onaj sa najvećim prinosom i dobrim funkcionalnim osobinama. Detekcija proteinskih frakcija vršena je na talasnoj dužini od 280 nm. Dobijeni hromatogram prikazan je na slici 20, dok su elucioni podaci primenjenog hromatografskog razdvajanja proteina ARA-izolata prikazani u tabeli 14.

Tabela 14. Elucioni podaci za razdvajanje proteina ARA-izolata preparativnom HIC tehnikom i faktori koncentrisanja frakcija ultrafiltracijom

Frakcija	Gradijentni korak* (mol/l)	Faktor koncentrisanja	Masa proteina (mg)
I	1,0	14	3,16
II	1,0 - 0,8	25	0,46
III	0,8 - 0,6	28	0,29
IV	0,6 - 0,4	25	0,27
V	0,4 - 0,0	22	0,95

* izražen kao koncentracija amonijum-sulfata



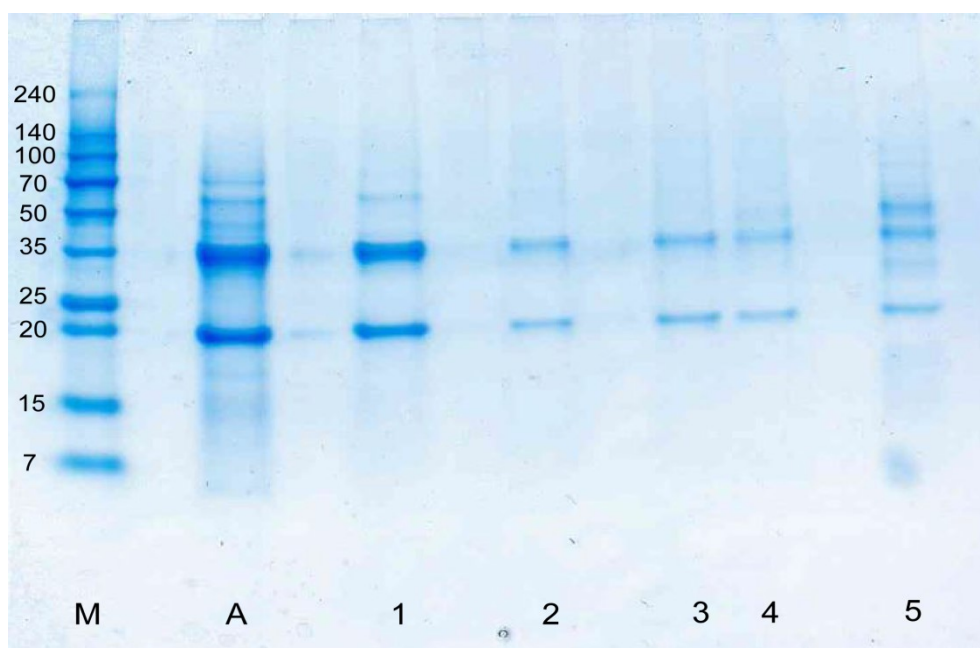
Slika 20. Hromatogram proteina ARA-izolata eluiranih u gradijentnim koracima sa *BioSuite Phenyl* preparativne HIC kolone

Opadajućom koncentracijom amonijum-sulfata u gradijentnim koracima, proteini ARA-izolata su eluirani sa kolone u frakcijama, čiji bi redosled, teorijski, trebalo da bude po rastućoj hidrofobnosti. Najveći proteinski pik je eluiran pri najvećoj koncentraciji soli, što bi moglo da ukaže da je relativno najhidrofilnija priroda površine bila karakteristika dominantnog masenog udela proteina, nešto manje od 60% (m/m). U naredne tri frakcije sa kolone su, u koracima smanjenja koncentracije soli po 0,2 mol/l, eluirani relativno niski maseni udeli proteina u opsegu od ~8% do ~10%. Poslednja frakcija proteina koja je eluirana mobilnom fazom bez soli sadržala je nešto veći maseni udeo proteina, gotovo 18%. Dobijeni rezultati koji su bili posledica različite hidrofилности/hidrofobnosti proteina ARA-izolata u skladu su sa činjenicom da se, generalno, proteini leblebije međusobno razlikuju po aminokiselinskom sastavu, odnosno sadržaju hidrofobnih i hidrofилnih bočnih grupa (*Singh and Jambunathan, 1982*) kao jedne od determinanata karakteristika površine.

Koncentrisane frakcije ARA-izolata leblebije su analizirane SDS PAGE tehnikom u pogledu proteinskog profila, FTIR spektroskopijom u pogledu udela elemenata sekundarne strukture, kao i ABTS testom kako bi im se odredila *in vitro* antioksidativna aktivnost.

4.3.1. SDS PAGE frakcija dobijenih preparativnom HIC tehnikom

Identifikacija proteina u frakcijama dobijenim nakon hromatografije sa hidrofobnim interakcijama izvršena je SDS PAGE tehnikom i dobijeni elektroforetogram je prikazan na slici 21.



Slika 21. Proteinski profili frakcija ARA-izolata, razdvojenih preparativnom HIC tehnikom, dobijeni SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom; marker (staza M), ARA-izolat proteinski izolat (staza A), Frakcija I (staza 1), Frakcija II (staza 2), Frakcija III (staza 3), Frakcija IV (staza 4) i Frakcija V (staza 5).

Sa dobijenog elektroforetograma može se zaključiti da se ARA-izolat, koji je bio podvrgnut frakcionisanju HIC-om, sastojao od proteinskih traka čije su se molekulske mase kretale u opsegu od 15 do 70 kDa. Jasno se može uočiti nekoliko glavnih traka sa molekulskim masama koje su imale

približne vrednosti 20 kDa, 35 kDa, 45 kDa, 55 kDa i 70 kDa, kao i manje izraženih traka nižih molekulskih masa, koje su tipične za proteinske izolate leblebije (*Chang et al.*, 2012). Važno je napomenuti da u rastvoru visoke koncentracije soli (1 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), u kom je vršeno rastvaranje ARA-izolata pre uvođenja u kolonu, nije ostvarena njegova potpuna rastvorljivost, pa je stoga nedostatak nekih proteinskih traka, vidljivih na slici 15, opravdan. Zato su dobijeni proteinski profili frakcija eluiranih sa kolone (slika 21) poređeni sa proteinskim profilima albuminske, globulinske i glutelinske frakcije proteina leblebije koje su rastvarane pod jednakim uslovima kao i ARA-izolat (slika S2). Uporedna analiza elektroforetograma je ukazala da bi dominantne proteinske trake sa molekulskim masama od ~35 kDa i 20 kDa u ARA-izolatu mogle da predstavljaju podjedinice globulina legumina (11S) (*Singh and Jambunathan*, 1982) ali i podjedinice sličnih molekulskih masa albumina i glutelina leblebije. Manje dominantne proteinske trake sa molekulskim masama od ~55 kDa i ~70 kDa mogle bi da odgovaraju podjedinicama globulina vicilina (7S), a one oko 55 kDa i podjedinicama koje su bile prisutne u albuminskoj frakciji rastvorenoj u 1 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Frakcija I koja je prva eluirana sa kolone, je pokazala da su dominantne trake na pozicijama od ~20 i 35 kDa, tipične za β - i α -podjedinice legumina, redom, kao i manje izražena traka (~55 kDa) koja se mogla pripisati i albuminima i globulinima leblebije, prema rezultatima HIC-a imale relativno najveću hidrofilitnost. Nije primećena bitna razlika između proteinskih traka kod Frakcija II i III koje su takođe odlikovale trake od ~20 kDa i ~35 kDa. Kod Frakcije IV moglo se uočiti je postojanje trake ~45 kDa, koja nije eluirana u prethodnim koracima, a koja je bila prisutna u albuminskoj frakciji rastvorenoj u amonijum-sulfatu, a i prema literaturi se može identifikovati kao protein ove frakcije (*Chang et al.* 2011; *Chang et al.*, 2012). Proteinski profil eluirane frakcije V, kao frakcije relativno najveće hidrofobnosti prema HIC-u, pokazao je trake na ~70 kDa (podjedinica vicilina), kao i na 45 kDa, 30 kDa, 17 kDa i 15 kDa, od kojih bi one nižih molekulskih masa mogle da se identifikuju kao polipeptidni lanci albuminske frakcije proteina leblebije.

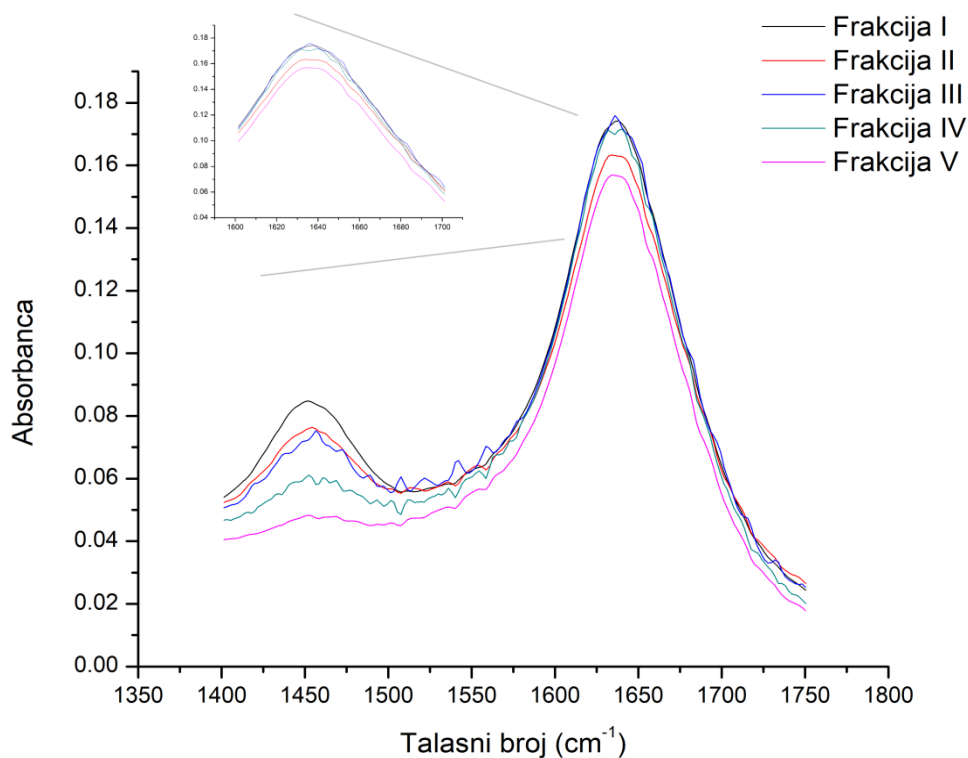
4.3.2. FTIR spektri frakcija dobijenih preparativnom HIC tehnikom

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom se široko koristi u strukturalnoj karakterizaciji proteina, dok istovremeno može da služi i za proučavanje veze između strukture proteina i njihove površinske hidrofobnosti. Spektri dobijenih frakcija razdvojenih preparativnom HIC tehnikom prikazani su na slici 22, u opsegu talasnog broja 1400 - 1700 cm^{-1} .

Dobijeni rezultati sa slike 22 su ukazali na razlike u spektrima frakcija eluiranih sa HIC kolone, i to naročito u oblasti Amid I (1600 - 1700 cm^{-1}) tj. oblasti karakterističnoj za sekundarnu strukturu proteina. Originalni spektri različitih frakcija proteinskog ARA-izolata razdvojenih tehnikom preparativne HIC koristili su se za dobijanje drugih izvoda. Njihova dalja analiza i izračunavanje udela elemenata sekundarne strukturne ukazali su na razlike u sadržaju α -heliksa i β -ravni među eluiranim proteinskim frakcijama (tabela 15).

Rezultati iz tabele 15 su pokazali povećanje sadržaja β -ravni po sledećem redosledu: Frakcija I < Frakcija II < Frakcija III < Frakcija IV < Frakcija V. Analizirano sa aspekta hidrofobnosti, može se zaključiti da je veći sadržaj β -ravni izračunat za frakcije koje su sa kolone eluirane pri nižim koncentracijama soli. Tako su Frakcije IV i V poslednje eluirane sa kolone, što ukazuje na njihovu relativno najveću hidrofobnost, a takođe je u saglasnosti sa većim sadržajem β -ravni u njihovoj sekundarnoj strukturi u odnosu na ostale frakcije. Objašnjenje se može pronaći u činjenici da visok sadržaj β -ravni dovodi do izloženosti hidrofobnih mesta na površini molekula proteina u većoj meri, čineći određenu proteinsku frakciju hidrofobnijom. *Wang et al.* (2011) su takođe izvestili o

pozitivnoj korelaciji između sadržaja β -ravni i površinske hidrofobnosti molekula proteina. Dakle, na ovaj način je i potvrđeno da je razdvajanje proteina ARA-izolata leblebije bilo moguće na osnovu razlika u njihovoj hidrofobnosti koje su proistekle iz razlika u udelima elemenata sekundarne strukture proteina.



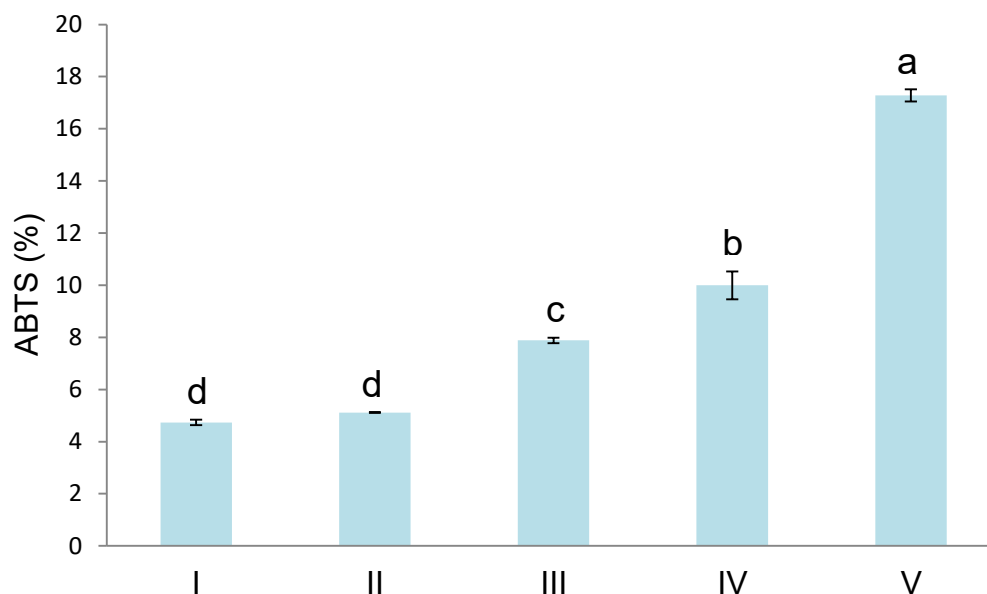
Slika 22. FTIR spektri frakcija proteina leblebije dobijenih preparativnom HIC tehnikom

Tabela 15. Udeo elemenata sekundarne strukture u proteinskim frakcijama, dobijenih preparativnom HIC tehnikom, na osnovu FTIR analize

	Frakcija I	Frakcija II	Frakcija III	Frakcija IV	Frakcija V
β -ravan (%)	40	43	49	50	59
α -heliks (%)	24	23	20	21	21

4.3.3. *In vitro* antioksidativna aktivnost frakcija dobijenih preparativnom HIC tehnikom

Proteini i proteinske frakcije ispoljavaju različite biološke aktivnosti među kojima su i antioksidativna svojstva koja prvenstveno zavise od aminokiselinskog sastava, sekvence, hidrofobnosti i dužine lanaca proteina (Karimi *et al.*, 2020). Potencijalne razlike u *in vitro* antioksidativnoj aktivnosti između eluiranih frakcija određene su ABTS testom i dobijeni rezultati su prikazani na slici 23.



Slika 23. *In vitro* antioksidativna aktivnost frakcija dobijenih preparativnom HIC tehnikom; različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema *Tukey*-ovom testu na nivou $p < 0,05$

Kao što se može zaključiti sa slike 23, frakcije eluirane pri nižim koncentracijama amonijum-sulfata (Frakcije IV i V) pokazale su veće antioksidativne aktivnosti u odnosu na ostale. Najveću antioksidativnu aktivnost od 17% pokazala je Frakcija V koja je i poslednja eluirana sa kolone (slika 20), dok su najmanje vrednosti dobijene za Frakcije II i I, redom (bez statistički značajne razlike). Objašnjenje ovakvih rezultata može se pronaći u činjenici da eluirane proteinske frakcije veće hidrofobnosti mogu da ostvaruju jače hidrofobne interakcije, a pokazano je da se ostvarivanjem ovih interakcija poboljšava interakcija sa slobodnim radikalima olakšavajući njihovo uklanjanje (*Phongthai and Rawdkuen, 2020*). Slični rezultati dobijeni su u istraživanjima *Tang and Zhuang (2014)*, prema kojima su proteinske frakcije zeina, koje odlikuje povećana hidrofobnost, pokazale izraženiju antioksidativnu aktivnost. Na osnovu ranijih istraživanja zaključeno je da hidrofobni aminokiselinski ostaci igraju glavnu ulogu u uklanjanju slobodnih radikala i da su odgovorni za visoka antioksidativna svojstva proteina (*Chen et al., 1996; Shahidi and Zhong, 2010*), sa čime su u saglasnosti dobijeni rezultati za antioksidativnu aktivnost proteinskih frakcija ARA-izolata leblebije razdvojenih HIC tehnikom.

4.4. Frakcije proteina leblebije i njihova svojstva

Predmet ovog dela istraživanja predstavljalo je izdvajanje frakcija proteina leblebije, njihova karakterizacija i određivanje funkcionalnih osobina, sa ciljem dubljeg razumevanja karakteristika i svojstava proteinskih izolata dobijenih alkalnim i enzimima potpomognutim alkalnim ekstrakcijama kao njihovih smeša. Sekvencijalnom ekstrakcijom vodom, i vodenim rastvorima natrijum-hlorida i natrijum-hidroksida iz leblebije su izdvojene proteinske frakcije albumina, globulina i glutelina, redom. Određivani su hemijski sastav, aminokiselinski sastav, kao i elektroforetski profili dobijenih frakcija proteina. Funkcionalnost albuminske, globulinske i glutelinske frakcije proteina evaluirana je određivanjem njihove rastvorljivosti, kapaciteta zadržavanja vode i ulja, emulgujućih i osobina

penjenja. Takođe, analizirane su i njihove biološke osobine u pogledu ispoljavanja *in vitro* antioksidativne aktivnosti.

4.4.1. Sekvencijalna ekstrakcija frakcija proteina leblebije

Prema Osbornovoj klasifikaciji (*Osborne, 1907*), biljni proteini se dele na osnovu rastvorljivosti na četiri glavne grupe - albumine (rastvorljive u vodi i razblaženim puferima), globuline (rastvorljive u rastvorima soli), prolamine (rastvorljive u 70 - 90% etanolu) i gluteline (rastvorljive u razblaženim kiselinama ili bazama). Sekvencijalnom ekstrakcijom obezmašćenog semena leblebije različitim rastvaračima dobijene su albuminska, globulinska i glutelinska frakcija u prinosima predstavljenim u tabeli 16.

Tabela 16. Prinos i efikasnost ekstrakcije proteinskih frakcija iz obezmašćenog brašna leblebije

	Prinos (g/100 g _{SM})	Efikasnost ekstrakcije* (%, m/m)
ALB	1,91±0,05	15,96±0,41
GLO	2,20±0,21	3,93±0,37
GLU	2,01±0,02	11,19±0,11

*efikasnost ekstrakcije je računata u odnosu na literaturne podatke o sadržaju frakcija u semenu leblebije Kabuli tipa (*Boukid (2021); Chang et al. (2011); Dhawan et al. (1991)*)

Ekstrakcija leblebije vodom, rastvorom soli i rastvorom baze rezultirala je prinosom od 1,91 g albumina, 2,20 g globulina i 2,01 g glutelina, redom, iz 100 g suve materije obezmašćenog semena leblebije. Slični rezultati dobijeni su u istraživanjima *Singh et al. (2008)* gde je ostvaren prinos albuminske frakcije od 1,8 g/100 g obezmašćene leblebije Kabuli tipa. Poznato je da proteini leblebije sadrže globulin kao glavni rezervni protein (~56%), zatim glutelin (~18%), albumin (~12,0%) i prolamin (~3%) (*Boukid, 2021; Singh and Jambunathan, 1982*). Shodno tome, efikasnost ekstrakcije proteinskih frakcija iznosila je 16% za albuminsku frakciju, 4% za frakciju globulina i 11% za frakciju glutelina. Uzimajući u obzir sadržaj masti u semenu leblebije, dobijeni rezultati su uporedivi sa rezultatima istraživanja *Da Silva et al. (2001)* koji su postigli efikasnost ekstrakcije albumina i glutelina iz leblebije od 16% i 10% redom (*Makeri et al., 2017*). Nizak prinos globulinske frakcije, ekstrahovane rastvorom NaCl, u skladu je sa rezultatima *Liu et al. (2008)* koji su takođe pokazali relativno nisku efikasnost ekstrakcije ove frakcije proteina (7%). Ovakvi rezultati se mogu objasniti promenama faza tokom sekvencijalne ekstrakcije koje mogu dovesti do unutrašnjih interakcija protein-protein, što dovodi do smanjenja ili povećanja rastvorljivosti proteinskih frakcija a samim tim i razlika u efikasnosti njihove ekstrakcije, odnosno prinosa (*Adebiyi et al., 2007*).

4.4.2. Hemijski sastav frakcija proteina leblebije

U cilju određivanja hemijskog sastava dobijenih frakcija proteina leblebije, analizirani su sadržaji proteina, pepela i skroba, i dobijeni rezultati, izraženi kao g/100 g suve materije, prikazani su u tabeli 17.

Analiza dobijenih rezultata je pokazala da se globulin leblebije u pogledu određivanih kategorija hemijskog sastava značajno razlikovao od albuminske i glutelinske frakcije. Naime,

sadržaji proteina i skroba su bili značajno veći a sadržaj pepela značajno manji od onih u ostale dve frakcije. Poznato je da kiseline i baze koje se koriste za podešavanje pH vrednosti za/tokom procesa ekstrakcije mogu doprineti stvaranju soli, odnosno povećanju sadržaja pepela kod ekstrahovanih proteina (Wu *et al.*, 2009). Takođe, dobro je poznato da ugljeni hidrati poseduju visok afinitet prema albuminima mahunarki (Genovese and Lajolo, 1998). Stoga, moguće je da su neki od ugljenih hidrata leblebije jonskom ili kovalentnom vezom povezani za albumin, što je u saglasnosti sa mogućnošću da je u ovoj frakciji prisutan veći sadržaj ugljenih hidrata (pod pretpostavkom da ugljeni hidrati, ne računajući skrob, čine razliku do 100% ukupnog sadržaja proteinskih frakcija (tabela 17)). Rezultati nižeg sadržaja proteina kod frakcije glutelina su u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima Chang (2010) o relativno niskom sadržaju proteina u frakciji glutelina iz semena leblebije. Veći (pretpostavljeni) sadržaj ugljenih hidrata (ne računajući skrob) kod frakcije glutelina može biti objašnjen činjenicom da je ova frakcija proteina ekstrahovana poslednja tokom postupka sekvencijalne ekstrakcije što je moglo doprineti većoj istovremenoj ekstrakciji ugljenih hidrata u odnosu na prethodne frakcije, kao što je predloženo u literaturi (Chang, 2010).

Tabela 17. Hemijski sastav albuminske, globulinske i glutelinske frakcije proteina leblebije

Sadržaj (g/100 g _{SM})	Albumin	Globulin	Glutelin
Protein	74,93±1,16 ^b	90,89± 0,96 ^a	73,57± 0,89 ^b
Skrob	0,26±0,03 ^b	0,69±0,01 ^a	0,19±0,01 ^b
Pepeo	7,72±0,32 ^b	5,73±0,04 ^a	7,64±0,20 ^b

različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema *Tukey*-ovom testu na nivou $p < 0,05$

4.4.3. Sekundarna struktura frakcija proteina leblebije

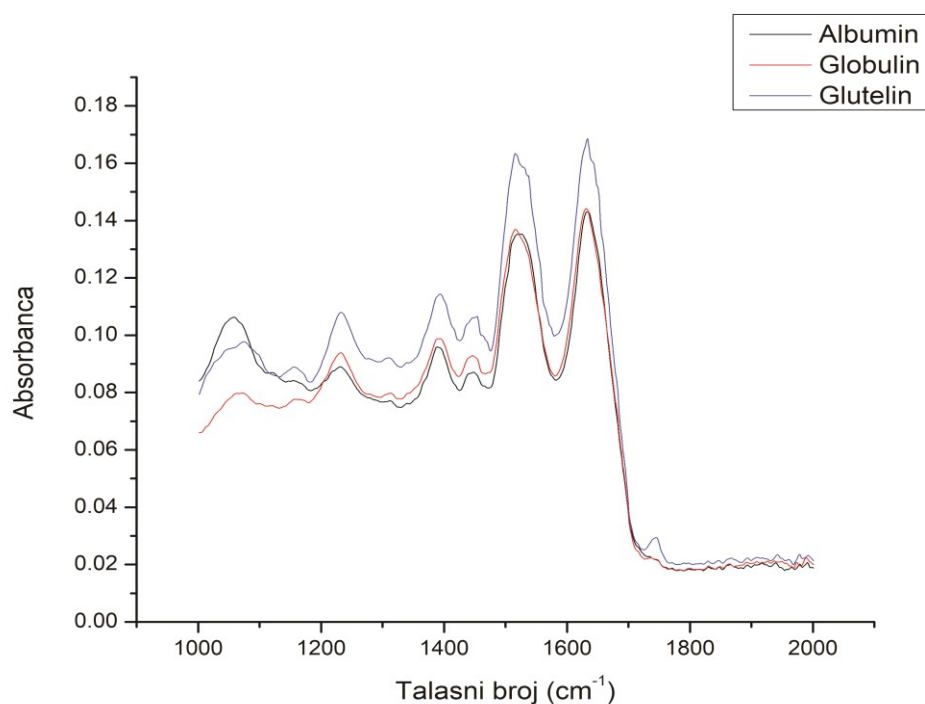
Frakcije albumina, globulina i glutelina ekstrahovane iz leblebije su pokazale neke razlike u FTIR spektrima (slika 24), kao posledicu razlika u sekundarnim strukturama.

Kao što već rečeno, amid I (1700-1600 cm^{-1}) region je najvažniji za analiziranje sekundarne strukture proteina. Regioni talasnih brojeva koji odgovaraju β -ravni ($\sim 1620 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1629 \text{ cm}^{-1}$ i $\sim 1638 \text{ cm}^{-1}$), α -heliksi ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ – 1660 cm^{-1}), nasumičnim kalemovima ($\sim 1643 \text{ cm}^{-1}$ - 1648 cm^{-1}) i β -zavojima ($\sim 1670 \text{ cm}^{-1}$ - 1680 cm^{-1}) (Carbonaro and Nucara, 2010; Shevkani *et al.*, 2019) korišćeni su za izračunavanje komponenata sekundarne strukture. Poznato je da udeli α -heliksa i β -ravni/ β -zavoja variraju između frakcija albumina, globulina i glutelina kod mahunarki (Makeri *et al.*, 2017). Uopšteno govoreći, najveći udeo komponenata sekundarne strukture kod svih izolovanih frakcija proteina leblebije činile su β -ravni, dok je učešće α -heliksa, β -zavoja i nasumičnih kalemova u sekundarnoj strukturi bilo manje (tabela 18).

Pa, ipak, dobijeni rezultati su pokazali da su se frakcije proteina leblebije međusobno razlikovale po udelima svih izračunatih elemenata sekundarne strukture. Tako je u albumiskoj frakciji bio dominantan udeo β -ravni (oko 60%), koji je bio praćen približno jednakim udelima α -heliksa i β -zavoja, dok prisustvo nasumičnih kalemova nije potvrđeno. Nešto niži ali takođe najveći udeo β -ravni bio je karakteristika i globulina leblebije, uz nešto veći udeo α -heliksa (gotovo 30%) u odnosu na ALB, ali i sa prisutnim strukturnim elementom nasumičnih kalemova. Ovi rezultati su bili u saglasnosti sa rezultatima Chang *et al.* (2022) za globulinsku frakciju izolovanu iz leblebije.

S druge strane, međusobni odnosi analiziranih elemenata sekundarne strukture proteina su za glutelinsku frakciju leblebije bili uočljivo različiti u odnosu na druge dve frakcije. Naime,

sekundarna struktura glutelinske frakcije je sadržala α -helikse i β -ravni u gotovo jednakom procentu (31% i 33%, redom), i dosta veći sadržaj nasumičnih kalemova (20%) u odnosu na druge dve frakcije proteina.



Slika 24. FTIR spektri albuminske, globulinske i glutelinske frakcije proteina leblebije

Tabela 18. Udeli elemenata sekundarne strukture frakcija proteina leblebije na osnovu FTIR analize

	α -heliks (%)	β -ravan (%)	nasumični kalemovi (%)	β -zavoji (%)
ALB	23	57	-	20
GLO	27	52	5	16
GLU	31	33	20	14

Može se, dakle, konstatovati da je postojala primetna razlika u sadržaju i β -ravni i nasumičnih kalemova između ekstrahovanih frakcija - glutelinska frakcija je sadržala veći procenat nasumičnih kalemova a manji β -ravni što sugeriše da je došlo do promene u strukturi proteina ove frakcije. Ovo se verovatno moglo desiti kao posledica alkalnih uslova tokom njene ekstrakcije, što se kao mogući uzrok spominje u literaturi (Du *et al.*, 2012a; Zhu *et al.*, 2010). Takođe, istraživanja Abugoch *et al.* (2003) su pokazala da je alkalni tretman modifikovao strukturu glutelinske frakcije iz amaranta, koja je postala delimično odvijena. Veći udeo nasumičnih kalemova (29%) u odnosu na ostale frakcije nađen je i u sekundarnoj strukturi glutelina pirinča (Xu *et al.*, 2016).

Poznato je da se ravnoteža sila koje drže podjedinice proteina na okupu menja tokom ekstrakcije, što zauzvrat može uticati na neka svojstva izolovanih biomolekula (Papalamprou *et al.*, 2009). Karakteristike nasumičnih kalemova suštinski zavise od karakteristika polipeptidnog lanca, i to najviše od hidrofobnih i hidrofilnih ostataka koji se nalaze na površini proteinskog molekula

(Smith et al., 1996). Veći sadržaj nasumičnih kalemova mogao bi da ukaže na povećanje neuređenih struktura u glutelinskoj frakciji, pa time i moguće povećanje njegove fleksibilnosti. Ovo je važno naglasiti s obzirom da je poznato da postoji dobra podudarnost između strukture proteina i njegove funkcionalnosti; odvijanje, konformaciona fleksibilnost proteina, kao i promene u strukturi mogu umnogome uticati na različita svojstva ovih molekula (Du et al., 2012b).

4.4.4. Aminokiselinski sastav frakcija proteina leblebije

Kvalitet proteina a samim tim i nutritivna vrednost prehrambenog proizvoda zavise od sadržaja prisutnih aminokiselina, kao i od fiziološke iskorišćenosti određene aminokiseline nakon njenog unosa u organizam (Elharadallou et al., 2015). Aminokiselinski sastav proteinskih frakcija albumina, globulina i glutelina leblebije prikazan je u tabeli 19.

Tabela 19. Aminokiselinski sastav albuminske, globulinske i glutelinske frakcije proteina leblebije

Sadržaj (g/100 g _{SM})	ALB	GLO	GLU
Asparaginska kiselina	7,31 ± 0,06 ^a	7,52 ± 0,01 ^a	6,92 ± 0,11 ^b
Treonin	2,28 ± 0,04 ^b	2,36 ± 0,02 ^b	3,25 ± 0,08 ^a
Serin	3,08 ± 0,04 ^b	3,36 ± 0,02 ^a	3,30 ± 0,06 ^a
Glutaminska kiselina	11,62 ± 0,08 ^b	12,13 ± 0,01 ^a	10,63 ± 0,08 ^c
Prolin	2,29 ± 0,01 ^a	2,11 ± 0,03 ^b	2,34 ± 0,01 ^a
Glicin	2,70 ± 0,06 ^b	3,04 ± 0,01 ^a	3,08 ± 0,01 ^a
Alanin	2,82 ± 0,04 ^c	3,33 ± 0,00 ^b	3,48 ± 0,02 ^a
Cistein	0,89 ± 0,03 ^a	0,94 ± 0,06 ^a	1,01 ± 0,04 ^a
Valin	3,26 ± 0,06 ^b	3,44 ± 0,02 ^b	3,95 ± 0,03 ^a
Metionin	1,62 ± 0,09 ^a	1,30 ± 0,05 ^a	1,57 ± 0,01 ^a
Izoleucin	3,76 ± 0,04 ^b	3,91 ± 0,05 ^b	4,44 ± 0,05 ^a
Leucin	5,16 ± 0,11 ^{ab}	4,77 ± 0,07 ^b	5,42 ± 0,04 ^a
Tirozin	2,54 ± 0,08 ^c	3,10 ± 0,02 ^b	4,21 ± 0,05 ^a
Fenilalanin	4,17 ± 0,06 ^{ab}	3,94 ± 0,05 ^b	4,29 ± 0,01 ^a
Histidin	2,12 ± 0,14 ^a	2,39 ± 0,02 ^a	2,38 ± 0,05 ^a
Triptofan	0,89 ± 0,01 ^b	0,74 ± 0,01 ^c	0,98 ± 0,01 ^a
Lizin	5,68 ± 0,06 ^a	4,16 ± 0,04 ^c	4,72 ± 0,03 ^b
Arginin	6,40 ± 0,12 ^b	8,65 ± 0,02 ^a	6,33 ± 0,04 ^b
Ukupan sadržaj	68,63 ± 0,25 ^c	71,22 ± 0,14 ^b	72,37 ± 0,04 ^a

različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema *Tukey*-ovom testu na nivou $p < 0,05$

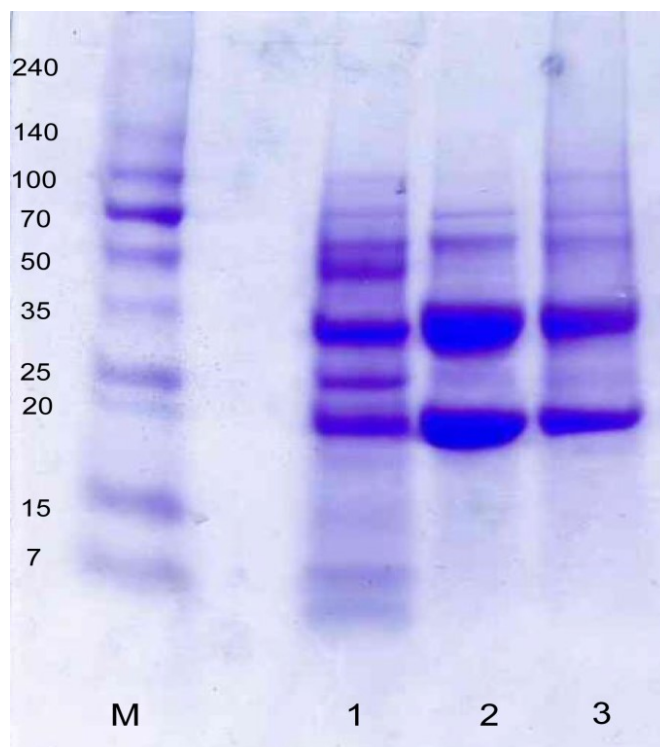
Rezultati analize aminokiselinskog sastava su pokazali da su glutaminska i asparaginska kiselina bile dominantno prisutne u svim ispitivanim frakcijama proteina leblebije, uz statistički značajno manji sadržaj obe aminokiseline u glutelinu. Veći sadržaj glutaminske i asparaginske kiseline u ovim frakcijama leblebije u odnosu na ostale aminokiseline bile su i rezultat istraživanja *Tavano et al.* (2008). S druge strane, cistein je bio najmanje zastupljena aminokiselina u svim frakcijama, što je u skladu sa činjenicom da su proteini mahunarki deficitarni u sadržaju aminokiseline koje sadrže sumpor (*Duranti and Scarafoni*, 1999). Iako su neka istraživanja ukazala na veći sadržaj cisteina u albuminskoj u odnosu na globulinsku i glutelinsku frakciju (*Chang*, 2006; *Murray and McC. Roxburgh*, 1984), to nije bio rezultat i ovog ispitivanja; naprotiv, sadržaj ove aminokiseline je bio najveći u glutelinskoj frakciji, iako bez statistički značajne razlike u odnosu na druge dve. Analiza je pokazala da su postojale značajne razlike u sadržaju tirozina i lizina u albuminima, globulinima i glutelinima leblebije. Albuminska frakcija je imala veći sadržaj lizina u poređenju sa globulinskom, što je u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima (*Liu et al.*, 2008).

Ukupni sadržaj hidrofobnih aminokiselina (alanin, valin, leucin, izoleucin, metionin, fenilalanin, prolin, glicin i triptofan) je bio veći u glutelinu u poređenju sa onim kod globulina i albumina. Sličan rezultat je dobijen u istraživanjima *Liu et al.* (2018) - glutelinska frakcija indijskog oraha je imala veći sadržaj hidrofobnih aminokiselina u poređenju sa druge dve proteinske frakcije. Upravo ova karakteristika glutelina bi mogla da ukaže na razliku u određenim interakcijama ove u odnosu na druge dve frakcije leblebije, što bi moglo da dovede i do razlika u nekim njihovim funkcionalnim svojstvima.

4.4.5. SDS-PAGE frakcija proteina leblebije

Nakon izoelektrične precipitacije i sušenja liofilizacijom, albuminska, globulinska i glutelinska frakcija proteina leblebije analizirane su tehnikom SDS-PAGE i dobijeni elektroforetogram prikazan je na slici 25.

Elektroforetski profili albuminske, globulinske i glutelinske frakcije pokazali su jedinstvene podjedinice, karakteristične za svaku od njih, u rasponima molekulskih masa od ~7 do ~90 kDa, zatim od ~20 do ~70 kDa i od ~20 do ~90 kDa, redom. Proteinska traka od ~90 kDa u albuminskoj frakciji može se dodeliti lipoksigenazi prisutnoj u leblebiji (92 kDa). Postojanje proteinskih traka sa najmanjom molekulskom masom od ~7 i ~25 kDa prisutnih u albuminskoj frakciji može se pripisati podjedinicama 2S albumina i tripsin-inhibitorima (*Clemente et al.*, 2000). Najizraženije trake globulina, molekulskih masa 20 kDa i 35 kDa, predstavljaju α - i β -podjedinice 11S legumina leblebije. *Clemente et al.* (2000) su takođe u svojim istraživanjima prikazali postojanje globulinskih podjedinica leblebije u intervalima molekulskih masa od oko 40 kDa do 46,5 kDa, i od 23 do 25 kDa. Takođe, traka sa molekulskom masom od oko 50 kDa karakteristična je za 7S frakciju vicilina. Pored toga, traka na ~55 kDa u stazi glutelina predstavlja tipičnu podjedinicu ove frakcije (*Chang*, 2006). Većina uočenih proteinskih traka kod frakcije glutelina leblebije može se uporediti sa podjedinicama glutelina pirinča (*Agboola et al.*, 2005; *Takaiwa et al.*, 1999) s obzirom na dokazanu homologost proteina ove dve biljne vrste (*Chang et al.*, 2011). Elektroforetski profili ALB i GLU proteinskih frakcija u saglasnosti su sa rezultatima drugih istraživačkih grupa dobijenim za ove dve frakcije (*Chang et al.*, 2011; *Singh et al.*, 2008).



Slika 25. Elektroforetogram frakcija proteina leblebije; standard (staza M), ALB (staza 1), GLO (staza 2) i GLU (staza 3); u staze sa frakcijama uneto je po 20 μ g proteina

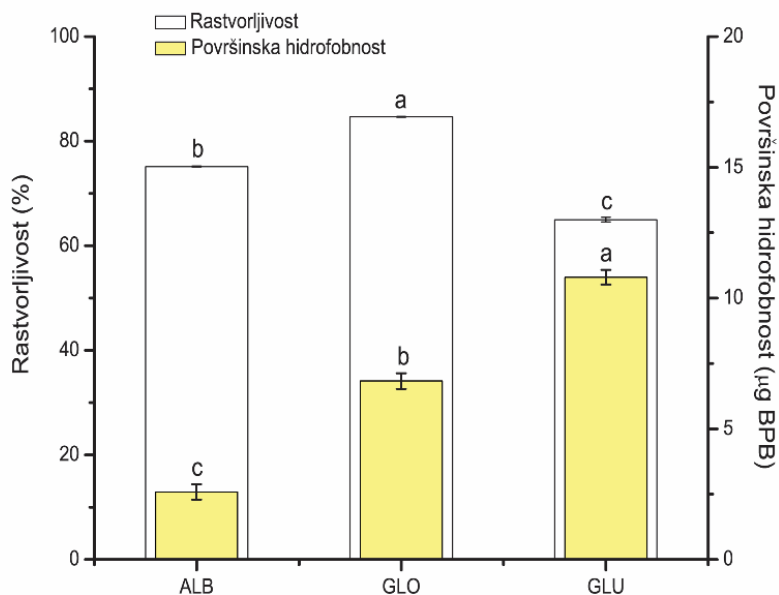
4.4.6. Funkcionalne osobine frakcija proteina leblebije

Poznato je da se proteini mogu inkorporirati u različite prehrambene proizvode kako bi se povećala njihova nutritivna vrednost i/ili se obezbedile njihove specifične i željene karakteristike (Singhal *et al.*, 2016). Funkcionalne osobine albumina, globulina i glutelina leblebije određivane su u cilju njihovog mogućeg korišćenja za različite primene u prehrambenoj industriji. Kao i za proteinske izolate, tako je i za frakcije proteina funkcionalnost analizirana određivanjem njihove rastvorljivosti, kapaciteta zadržavanja vode i ulja, emulgujućih svojstava i sposobnosti penjenja.

4.4.6.1. Rastvorljivost frakcija proteina leblebije

Rastvorljivost proteina predstavlja veoma važnu osobinu s aspekta njihove primene u prehrambenoj industriji. Dobijeni rezultati za rastvorljivost frakcija albumina, globulina i glutelina leblebije predstavljani su na slici 26.

Dobijeni rezultati su pokazali da su postojale značajne razlike u rastvorljivosti izolovanih frakcija leblebije. Tako je na pH 9, najveća rastvorljivost (oko 85%) izmerena za frakciju globulina dok je najmanja rastvorljivost (oko 65%) zabeležena za frakciju glutelina. Sličan rezultat zapažen je u istraživanjima Chang *et al.* (2022) u kom je frakcija globulina leblebije pokazala visoku rastvorljivost (>90%) u alkalnim uslovima (pH 9 i 10). Takođe, dobijeni rezultati rastvorljivosti frakcija proteina leblebije se slažu sa literaturnim podacima o rastvorljivosti odgovarajućih frakcija proteina iz biljnih izvora i to glutelina pirinča (Agboola *et al.*, 2005), globuline ovsa i pasulja (Ma and Harwalkar, 1984; Mundi and Aluko, 2012) i albumine prosa i lanenog semena (Akharume *et al.*, 2020; Nwachukwu and Aluko, 2018).



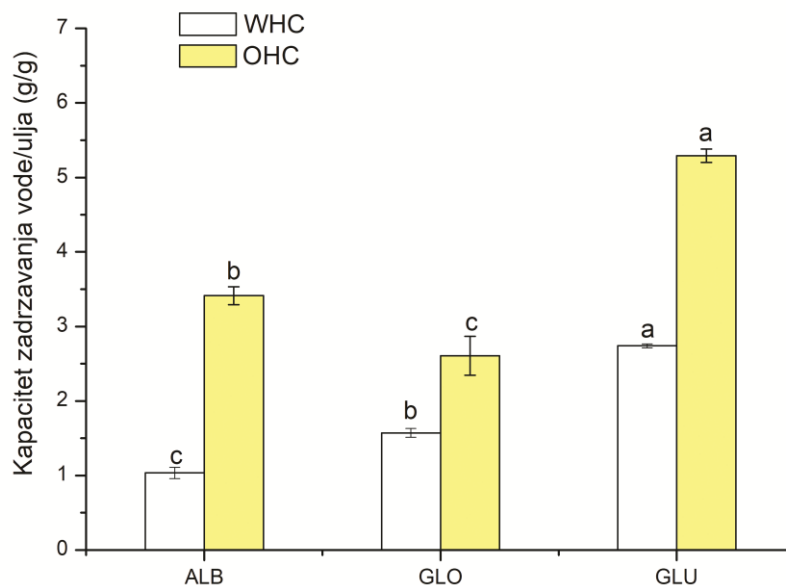
Slika 26. Rastvorljivost i površinska hidrofobnost kod ALB, GLO i GLU frakcija proteina leblebije; različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema *Tukey*-ovom testu na nivou $p < 0,05$

Kao glavni faktori koji utiču na rastvorljivost proteina izdvajaju se aminokiselinski sastav, fleksibilnost i raspodela hidrofilnih i hidrofobnih ostataka na površini molekula proteina. Hidrofilne/hidrofobne grupe u velikoj meri utiču na rastvorljivost proteina i igraju glavnu ulogu u povećanju/smanjenju ove osobine. Niža rastvorljivost glutelina može biti povezana i objašnjena sadržajem hidrofobnih aminokiselina u ovoj frakciji, koji je dat u prethodnom poglavlju (4.4.4). Naime, pokazalo se da glutelinska frakcija ima veći sadržaj hidrofobnih aminokiselina u odnosu na albuminsku i globulinsku, što se moglo odraziti na interakcije proteina sa molekulima vode, a samim tim uticati i na rastvorljivost. Takođe, rezultati niže rastvorljivosti glutelina su u dobroj saglasnosti i sa rezultatima za površinsku hidrofobnost (slika 26) - ova frakcija je imala čak pet puta veću površinsku hidrofobnost u odnosu na albuminsku, dok je u odnosu na globulinsku bila skoro dvostruko veća. Veća neuređenost molekula proteina glutelinske frakcije, koja se ogledala i u većem sadržaju nasumičnih kalemova prisutnih u sekundarnoj strukturi (tabela 18), verovatno je doprinela i većoj hidrofobnosti ove u odnosu na ostale frakcije. Posledično, povećanje površinske hidrofobnosti moglo je takođe da rezultira sprečavanjem interakcija protein-voda a samim tim i smanjenjem rastvorljivosti.

4.4.6.2. Kapaciteti zadržavanja vode i ulja frakcija proteina leblebije

Zadržavanje vode/ulja, kao osobina proteina, umnogome utiče na karakteristike i kvalitet gotovih prehrambenih proizvoda. Rezultati kapaciteta zadržavanja vode (WHC) i ulja (OHC) izolovanih frakcija proteina leblebije prikazani su na slici 27.

Izolovane frakcije proteina leblebije su pokazale različitu sposobnost zadržavanja vode i ulja, a statistička analiza dobijenih rezultata je ukazala na značajnost ovih razlika. Najveći WHC je imao glutelin i to više od 2,5 puta veći od onog albuminske frakcije. Slični rezultati dobijeni su i za kapacitet zadržavanja ulja; i za ovaj pokazatelj je glutelin imao najveću vrednost, koja je bila nešto više od dvostruko veća u odnosu na, u ovom slučaju, globuline koji su imali najmanji OHC.



Slika 27. Kapaciteti zadržavanja vode (WHC) i ulja (OHC) ALB, GLO i GLU frakcija proteina leblebije; različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema *Tukey*-ovom testu na nivou $p < 0,05$

Poznato je da struktura proteina ima veliki uticaj na njihovu funkcionalnost (*Hui, 2006*). Kao što je već objašnjeno, povećan sadržaj nasumičnih kalemova u sekundarnoj strukturi glutelina bi se mogao objasniti odvijanjem/otvaranjem i povećanom fleksibilnošću molekula ove frakcije proteina leblebije. Ovakve konformacione promene verovatno su uticale na povećanu izloženost bočnih lanaca aminokiselina prema okruženju, što je samim time uticalo na kapacitete WHC/OHC. Stoga se najveće vrednosti kapaciteta zadržavanja vode/ulja glutelinske frakcije mogu posmatrati kao usko povezane sa njegovom fleksibilnijom strukturom i izlaganjem polarnih/nepolarnih bočnih grupa koje posledično povećavaju broj mesta za vezivanje vode i ulja i omogućavaju dobru sposobnost zadržavanja, kao što je predloženo u literaturi (*Mustafa and Reaney, 2020*).

Generalno, dobijeni rezultati sugerišu da su sve izolovane frakcije proteina leblebije imale dobre vrednosti zadržavanja vode/ulja, poželjne za njihovu upotrebu u prehrambenoj industriji. Dodatno, može se zapaziti dobro slaganje većih vrednosti WHC i OHC za glutelin sa rezultatima kapaciteta zadržavanja vode/ulja kod proteinskih izolata; naime, proteinski izolati dobijeni uz pomoć enzimskog pretretmana pokazali su veće vrednosti WHC/OHC u odnosu na izolat iz samo alkalne ekstrakcije, što je u skladu sa pretpostavkom o većem udelu glutelinskih proteina u njima.

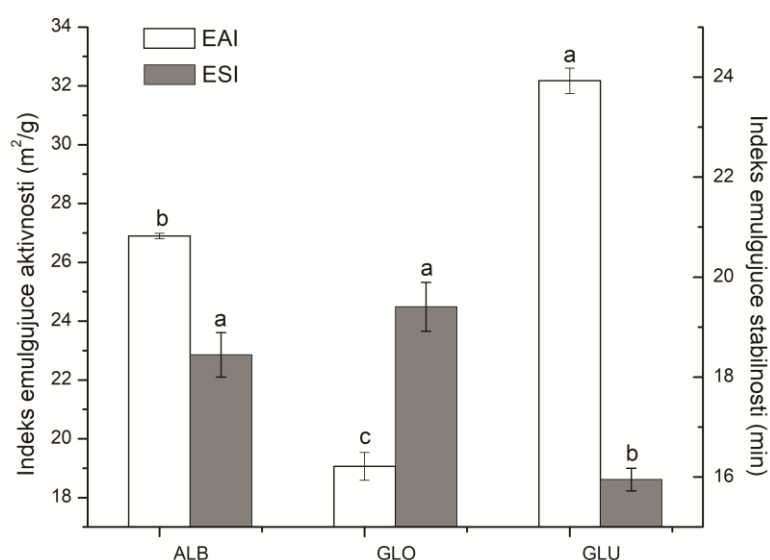
4.4.6.3. Emulgujuća svojstva i svojstva penjenja frakcija proteina leblebije

Rezultati indeksa emulgujuće aktivnosti (EAI) i emulgujuće stabilnosti (ESI) izolovanih frakcija proteina leblebije prikazani su na slici 28, na osnovu kojih su uočene značajne varijacije ovih svojstava među ispitivanim uzorcima.

EAI glutelina bio je značajno ($p < 0,001$) veći od rezultata dobijenih za albumin i globulin. Poznato je da EAI i ESI proteina u najvećoj meri zavise od konformacionih faktora kao što su fleksibilnost molekula i izbalansiran hidrofobno-hidrofilni odnos (*Li et al., 2019*). Naime,

konformacione promene i izlaganje aminokiselinskih ostataka koji su se nalazili u unutrašnjosti molekula omogućavaju proteinu da interaguje sa fazom ulja zbog njegove hidrofobne prirode, a u isto vreme i sa fazom vode zbog njegove hidrofilne prirode (Lam and Nickerson, 2013). Zato se proteini sa fleksibilnijom strukturom lakše adsorbuju na granici faza ulje-voda i stoga imaju bolje emulgjujuće karakteristike (Jiang et al., 2015). Dobijeni rezultat za najveći EAI glutelina je u skladu sa rezultatima njegove sekundarne strukture koja je pokazala najveći sadržaj nasumičnih kalemova. Veća fleksibilnost molekula glutelina kao moguća posledica ovoga, rezultirala je povećanom površinskom hidrofobnošću ove frakcije (slika 26), čime se može objasniti njena bolja interakcija sa uljanom fazom (Ajibola et al., 2016), odnosno, veći EAI. Karaca et al. (2011) su utvrdili da su vrednosti EAI niže za proteine dobijene iz ekstrakcije rastvorima soli, što sugerise da su takvi proteini manje efikasni kao emulgatori. Takvo zapažanje je u skladu sa najmanjim rezultatom EAI dobijenim za globulinsku frakciju proteina leblebije. Takođe, treba istaći da su EAI frakcija glutelina i albumina bili znatno veći od onih dobijenih za proteinske izolate iz soje (L'Hocine et al., 2006), proteinske frakcije graška (Akharume et al., 2020) i iz ljuski pirinča (Adebiyi et al., 2007).

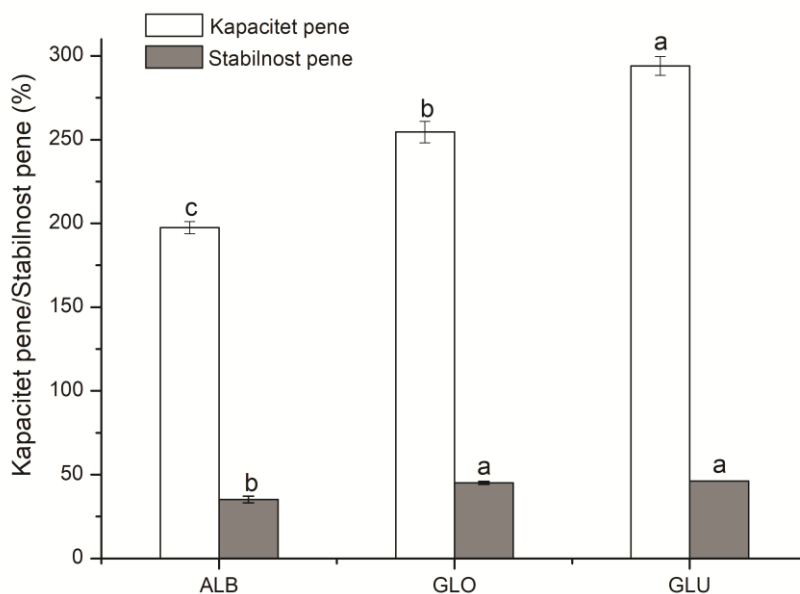
Rezultati za stabilnost emulzija ispitivanih frakcija leblebije su pokazali drugačiji trend u odnosu na indeks emulgjujuće aktivnosti. Značajno veći rezultati za stabilnost emulzija dobijeni su za globulinsku i albuminsku frakciju u poređenju sa frakcijom glutelina. Veća stabilnost emulzija kod albuminske frakcije može se objasniti činjenicom da ova frakcija ima proteine i nižih molekulskih masa u odnosu na druge dve, ali, prema literaturi, i moguću veći procenat vezanih polisaharida koji doprinose stabilnosti emulzija (Lam and Nickerson, 2013). To je u skladu sa rezultatima dobijenim SDS PAGE tehnikom koji su pokazali veći broj proteinskih traka nižih molekulskih masa (slika 25), kao i pretpostavljenim većim sadržajem ugljenih hidrata (tabela 17) u albuminskoj frakciji u odnosu na druge dve. Slični rezultati dobijeni su u istraživanjima Akharume et al. (2020) po kojima je albuminska frakcija iz prosa pokazala veću emulgjujuću stabilnost od ostalih frakcija.



Slika 28. Indeks emulgjujuće aktivnosti (EAI) i stabilnosti (ESI) ALB, GLO i GLU frakcija proteina leblebije; različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema Tukey-ovom testu na nivou $p < 0,05$

Svojstva penjenja su određena sposobnošću proteina da se brzo adsorbuju na granici faza vazduh-tečnost tokom homogenizacije i formiraju kohezivne viskoelastične filmove oko mehurića vazduha putem intermolekularnih interakcija (Mine, 1995). Izolovane frakcije proteina leblebije su okarakterisane u pogledu kapaciteta pene (FC) i stabilnosti pene (FS) i dobijeni rezultati su prikazani na slici 29. Rezultati FC i FS su pokazali da su svojstva penjenja glutelina leblebije bila bolja u poređenju sa ovim svojstvima albumina i globulina.

Dobro je poznato da karakteristike površine molekula proteina igraju ključnu ulogu u formiranju i stabilizaciji pene. Proteini veće fleksibilnosti i veće površinske hidrofobnosti su pogodniji za formiranje pene (German et al., 1983; Townsend and Nakai, 1983). Delimično odvijeni/odmotani molekuli proteina se udružuju da bi formirali stabilizujući film oko mehurića vazduha, što je neophodno za stvaranje i stabilnost pene (Lomakina and Miková, 2006). Prethodno prikazani rezultati ispitivanja sekundarne strukture su pokazali da frakcija glutelina leblebije ima veći sadržaj nasumičnih kalemova što ukazuje na fleksibilniju i više odvijenu/odmotanu strukturu ove frakcije u odnosu na druge dve ispitivane. Veći rezultati za FC i FS ostvareni kod glutelina mogu biti povezani sa njegovom sekundarnom strukturom koja bi mogla dovesti do veće adsorpcije i boljeg preuređivanja na granici faza vazduh-voda. Štaviše, rezultati svojstva penjenja glutelina bili su u skladu sa njegovom većom hidrofobnošću, kao što su prethodni rezultati pokazali.



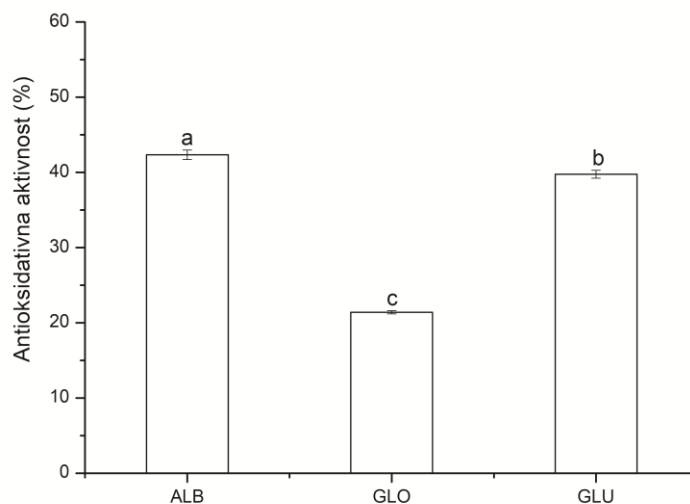
Slika 29. Svojstva penjenja ALB, GLO i GLU frakcija proteina leblebije; različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema Tukey-ovom testu na nivou $p < 0,05$

Dodatno, može se zapaziti dobro slaganje superiornijih rezultata za emulgujuće osobine i svojstava penjenja kod glutelinske frakcije sa rezultatima za ova svojstva proteinskih izolata; naime, proteinski izolati dobijeni alkalnom ekstrakcijom nakon enzimskog pretretmana pokazali su veće vrednosti ovih funkcionalnih osobina u odnosu na izolat iz samo alkalne ekstrakcije, što je u skladu sa pretpostavkom da je u njima prisutan veći udeo glutelina.

4.4.7. *In vitro* antioksidativna aktivnost frakcija proteina leblebije

Pored funkcionalnih i nutritivnih svojstava, proteini imaju potencijal da uklone slobodne radikale i zbog toga dodatno blagotvorno utiču na zdravlje ljudi. Upravo iz tog razloga određivana je *in vitro* antioksidativna aktivnost frakcija albumina, globulina i glutelina leblebije i to ABTS testom a dobijeni rezultati prikazani su na slici 30.

Dobijeni rezultati su pokazali da je albuminska frakcija pokazala najveću antioksidativnu aktivnost, dok je u odnosu i na nju i na glutelinsku, globulinska frakcija pokazala statistički značajno niži rezultat. Visoka antioksidativna aktivnost direktno je povezana sa jedinstvenim aminokiselinskim sastavom, strukturom i karakteristikama bočnih grupa aminokiselina u molekulu proteina (Matemu *et al.*, 2021). Ranija istraživanja su potvrdila vezu između sadržaja hidrofobnih aminokiselina i mogućnosti uklanjanja ABTS radikala; tako je veći sadržaj hidrofobnih aminokiselina u glutelinskoj frakciji proteina pirinča rezultirao većom antioksidativnom aktivnošću ove frakcije (Wang *et al.*, 2016). Slični rezultati za dobru antioksidativnu aktivnost glutelinske frakcije potvrđeni su i u istraživanjima (Li *et al.*, 2018), prema kojima je glutelin kokosa pokazao bolju antioksidativnu aktivnost u odnosu na albuminsku i globulinsku frakciju. Pa ipak, iako je ukupni sadržaj hidrofobnih aminokiselina i udeo nasumičnih kalemova u glutelinu leblebije bio najveći, antioksidativna aktivnost albumina je u ovim istraživanjima pokazala najveći potencijal za uklanjanje ABTS⁺ radikala, što se može objasniti većom rastvorljivošću ove frakcije u odnosu na glutelinsku. Poznato je, naime, da je veća rastvorljivost proteina povezana sa njihovom većom antioksidativnom aktivnošću, s obzirom da je na ovaj način omogućen olakšan kontakt i interakcije između antioksidanta i reaktivnih radikalskih vrsta (Zou *et al.*, 2016).



Slika 30. *In vitro* antioksidativna aktivnost albuminske, globulinske i glutelinske frakcije proteina leblebije određena ABTS metodom; različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema Tukey-ovom testu na nivou $p < 0,05$

4.5. Nanočestice pripremljene iz frakcija proteina leblebije

Jedan deo ispitivanja odnosio se na pripremu nanočestica od frakcija albumina, globulina i glutelina leblebije primenom termičkog tretmana i njihovu karakterizaciju, a dobijeni rezultati su prikazani u narednim poglavljima. Analiziran je uticaj varijabli - vremena zagrevanja (10 i 20 min) i

pH (7 i 9,3) na najvažnije karakteristike proteinskih nanočestica i to veličinu čestica, stabilnost tokom skladištenja i hidrofobnost, kao i na mutnoću nastalih disperzija. Određeni su i kapaciteti vezivanja hidrofилnih supstanci, na primeru askorbinske kiseline, i hidrofobnih supstanci, i to linolne kiseline. Takođe, izmerena je i *in vitro* antioksidativna aktivnost pripremljenih nanočestica. Sve analizirane osobine sagledane su sa aspekta razlika u karakteristikama i svojstvima proteinskih frakcija iz primenjenih ekstrakcionih protokola.

4.5.1. Mutnoća disperzija proteinskih nanočestica

Vizuelni prikaz i vrednosti zamućenja disperzija frakcija proteina leblebije zagrevanih na 90 °C tokom 10 i 20 min, na pH 7 i 9,3 prikazani su na slici 31 i tabeli 20. Ove dve vrednosti pH izabrane su kao jedna bliska, a druga udaljena od izoelektričnih tački frakcija albumina (pI 3,4), globulina (pI 4,7) i glutelina (pI 4,4) koje su prethodno eksperimentalno određene.

Tabela 20. Mutnoća disperzija ALB, GLO i GLU frakcija proteina leblebije u vodi

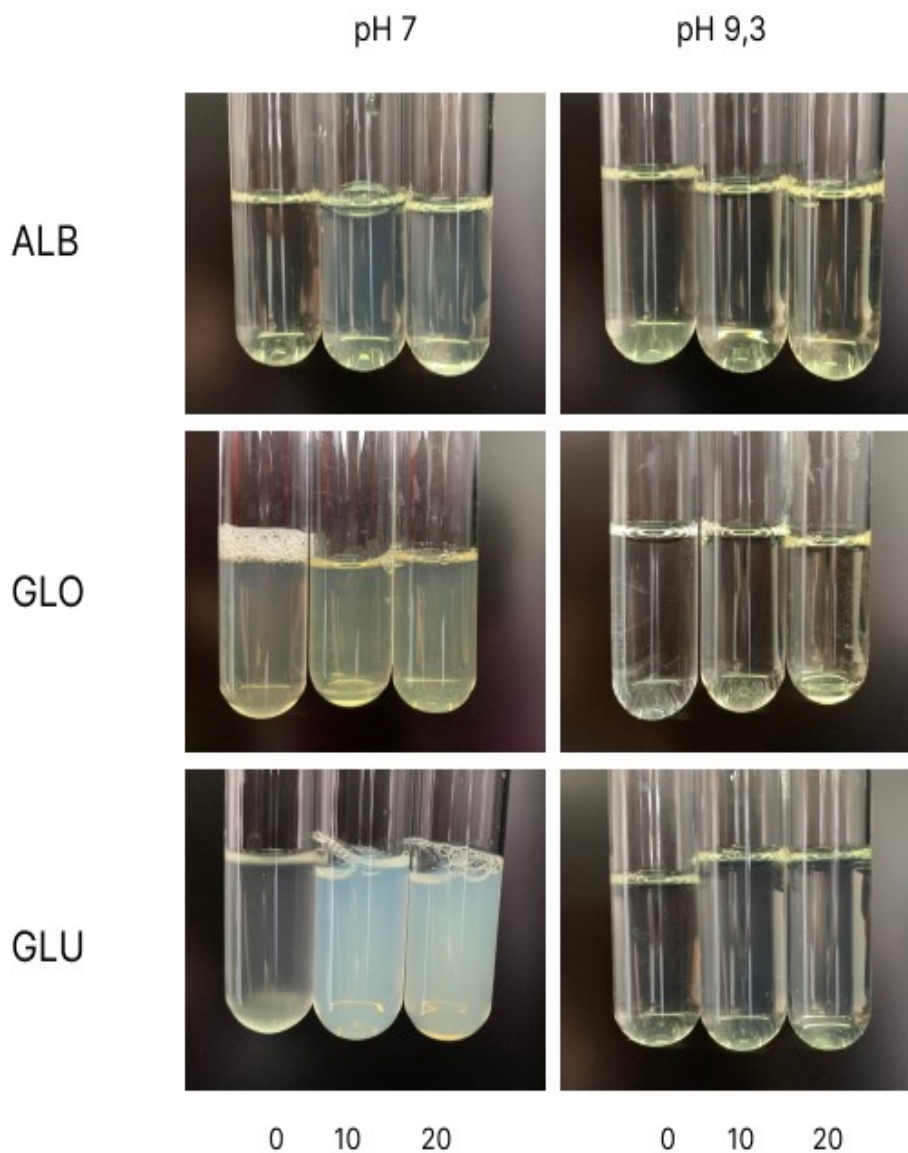
	Mutnoća ($A_{400\text{ nm}}$)		
	ALB	GLO	GLU
pH 7, bez tretmana	0,133±0,006 ^b	0,189±0,016 ^b	0,424±0,029 ^b
pH 7, 10 min, 90 °C	0,319±0,001 ^a	0,536±0,030 ^a	0,712±0,002 ^a
pH 7, 20 min, 90 °C	0,328±0,008 ^a	0,533±0,033 ^a	0,725±0,004 ^a
pH 9,3, bez tretmana	0,149±0,001 ^c	0,136±0,015 ^b	0,141±0,012 ^b
pH 9,3, 10 min, 90 °C	0,169±0,001 ^b	0,214±0,004 ^a	0,205±0,006 ^a
pH 9,3, 20 min, 90 °C	0,174±0,001 ^a	0,219±0,003 ^a	0,207±0,007 ^a

Uslovi termičkog tretmana: 90 °C tokom 10 i 20 min na pH 7 i 9,3. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (n = 3). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema *Tukey*-ovom testu na nivou $p < 0,05$.

Rezultati su pokazali da je pH vrednost u velikoj meri uticala na intenzitet zamućenja proteinskih disperzija nakon što su rastvori albumina, globulina i glutelina podvrgnuti termičkom tretmanu. Najveće zamućenje je zabeleženo kod nanočestica dobijenih iz GLU, zatim GLO i ALB pri pH 7, dok je na pH 9,3 uočen sličan trend. Nakon termičkog tretmana, sve proteinske frakcije su pokazale veoma značajno povećanje zamućenja na obe vrednosti pH, uz zapažanje da je porast zamućenja, u odnosu na rastvor bez tretmana, bio manji na višoj pH vrednosti. Kao što se može videti sa slike 31, povećanje zamućenja disperzija frakcija proteina leblebije pri nižem pH je bilo uočljivije, kao moguća posledica intenzivnije agregacije proteina.

Poznato je da pod uticajem povišenih temperatura dolazi do otvaranja strukture proteina i izlaganja hidrofobnih grupa na površinu molekula koje posledično učestvuju u hidrofobnim interakcijama i dovode do agregacije proteina (*Wang et al.*, 2010a). Najmanje vrednosti zamućenja izmerene su kod albuminskih nanočestica, što se može objasniti činjenicom da je izolektrična tačka ove proteinske frakcije najviše udaljena od pH vrednosti na kojima je izvođen termički tretman. Takođe, poznato je da termički tretman različito utiče na različite tipove sekundarnih struktura u molekulu proteina, pa se stoga razlike u mutnoći mogu pripisati različitom uticaju termičkog

tretmana na α -helikse i β -ravni/ β -zavoje u sekundarnim strukturama albuminske, globulinske i glutelinske frakcije. U tom smislu postoji dobro slaganje između vrednosti zamućenja i veličine stvorenih nanočestica, koje će biti opisane u sledećem poglavlju (4.5.2). Iz prikazanih rezultata se takođe može zapaziti da produžetak termičkog tretmana uglavnom nije doveo do većih promena u mutnoći kod svih pripremljenih nanočestica i na obe ispitivane vrednosti pH.



Slika 31. Vizuelni prikaz disperzija ALB, GLO i GLU leblebije; termički tretman: 90 °C, 10 i 20 min, pH 7 i 9,3

4.5.2. Raspodela veličina proteinskih nanočestica

Da bi se bolje okarakterisale pripremljene nanočestice i objasnile potencijalne razlike u promeni strukture proteinskih frakcija nakon zagrevanja, pored mutnoće analizirana je i veličina čestica i indeks polidisperznosti (PDI) svih pripremljenih nanostrukture. Raspodela veličine čestica (PSD) netretiranih i termički tretiranih rastvora proteinskih frakcija prikazana je na slici S3. Rezultati PSD-a pokazuju da je toplotni tretman izazvao povećanje srednjeg prečnika svih proteinskih frakcija

i omogućio stvaranje nanostruktura sa prečnikom manjim od 100 nm. Kao što je poznato, termički tretman uzrokuje intenzivnu agregaciju proteina (Mession *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2019), koja je u ovom ekperimentu bila praćena stvaranjem proteinskih nanoćestica većih dimenzija u odnosu na dimenzije molekula proteina u rastvorima frakcija pre termičkog tretmana i stoga većim zamućenjem. Kao što je bio slučaj kod proteinskih izolata, tako je i kod frakcija proteina leblebije zagrevanje iznad temperature denaturacije verovatno dovelo do delimičnog razvijanja strukture proteina i izlaganja hidrofobnih grupa na površinu molekula, što je moglo favorizovati njihovu agregaciju. Variranjem vremena termičkog tretmana i vrednosti pH dobijene su nanoćestice različitih veličina u rasponu od 23 do 405 nm (tabela 21). Razlike u veličini nanoćestica pripremljenih od frakcija proteina leblebije mogu se objasniti razlikama u sadržaju sekundarnih strukturnih komponenata (α -heliksa, β -ravani/ β -zavoja) jer razgradnja ovih struktura može dovesti do razlika u pripremljenim nanoćesticama i njihovim veličinama.

Tabela 21. Parametri veličine nanoćestica pripremljenih termičkim tretmanom ALB, GLO i GLU frakcija proteina leblebije

	Pik 1 (nm)	Pik 2 (nm)	Srednji prečnik (nm)	PdI
ALB				
pH 7, bez tretmana	11±0	-	74±3	0,552±0,009
pH 7, 10 min, 90 °C	59±11	-	105±4	0,171±0,005
pH 7, 20 min, 90 °C	56±8	-	85±2	0,173±0,006
pH 9,3, bez tretmana	11±1	-	64±5	0,541±0,036
pH 9,3, 10 min, 90 °C	27±2	-	76±2	0,467±0,003
pH 9,3, 20 min, 90 °C	26±2	-	70±1	0,401±0,011
GLO				
pH 7, bez tretmana	18±0	-	87±2	0,515±0,037
pH 7, 10 min, 90 °C	79±1	-	97±4	0,241±0,004
pH 7, 20 min, 90 °C	75±4	-	100±6	0,260±0,004
pH 9,3, bez tretmana	12±0	-	74±0	0,566±0,015
pH 9,3, 10 min, 90 °C	40±1	-	71±2	0,275±0,032
pH 9,3, 20 min, 90 °C	35±2	-	77±2	0,416±0,012
GLU				
pH 7, bez tretmana	27±2	-	164±1	0,466±0,025
pH 7, 10 min, 90 °C	83±3 (54%)	405±16 (46%)	166±3	0,280±0,008
pH 7, 20 min, 90 °C	84±6 (50%)	377±25 (48%)	176±3	0,315±0,026
pH 9,3, bez tretmana	14±0	-	40±2	0,532±0,023
pH 9,3, 10 min, 90 °C	24±3	-	66±1	0,290±0,033
pH 9,3, 20 min, 90 °C	26±2	-	66±1	0,232±0,010

Uslovi termičkog tretmana: 90 °C tokom 10 i 20 min na pH 7 i 9,3.

Najveće čestice su pripremljene iz GLU na pH 7, što se može objasniti relativno najvećim udelom nasumičnih kalemova u sekundarnoj strukturi ove frakcije, za koje se može pretpostaviti da su se transformisali tokom termičkog tretmana u β -ravni (tabela 22), kao što je prethodno sugerisano (Lin *et al.*, 2004, 2002). Proteinske nanočestice najmanjeg prečnika su takođe pripremljene od GLU frakcije ali na pH 9,3, verovatno zbog stabilnijih α -heliksa prisutnih u njegovoj strukturi i dodatno manjeg gubitka sadržaja β -ravni, u skladu sa prethodnim istraživanjima (Wang *et al.*, 2014). Pored nanočestica pripremljenih iz glutelina, na višoj ispitivanoj pH dobijene su i manje veličine nanočestica pripremljenih iz ALB frakcije, moguće je i zbog toga što je ovu frakciju proteina odlikovalo prisustvo proteina nižih molekulskih masa u netretiranom rastvoru (slika 25).

Tabela 22. Udeo komponenata sekundarne strukture u proteinskim nanočesticama pripremljenim termičkim tretmanom frakcija proteina leblebije na osnovu FTIR analize

	α -heliks	β -ravan	nasumični kalemovi	β -zavoji
ALB				
pH 7, bez tretmana	23	57	-	20
pH 7, 10 min, 90 °C	37	33	18	12
pH 9.3, 10 min, 90 °C	29	33	23	16
GLO				
pH 7, bez tretmana	27	53	5	16
pH 7, 10 min, 90 °C	31	43	9	15
pH 9.3, 10 min, 90 °C	30	39	17	13
GLU				
pH 7, bez tretmana	31	33	20	14
pH 7, 10 min, 90 °C	29	42	16	12
pH 9.3, 10 min, 90 °C	19	31	29	20

Monomodalni PSD je dobijen za sve uzorke (pripremljene nanočestice, kao i za sve netretirane rastvore frakcija proteina) na obe vrednosti pH, sa izuzetkom bimodalnog PSD nakon 10 i 20 minuta zagrevanja na pH 7 glutelinske frakcije proteina. Rezultati za vrednosti PdI su pokazali smanjenje u poređenju sa rastvorima netretiranih proteina (<0,4), što ukazuje na umerenu polidisperznost (Sengupta and Sarkar, 2022). Srednji prečnik čestica i zamućenje su porasli tokom prvih 10 minuta zagrevanja, što ukazuje da se tokom ovog perioda dešavala ubrzana agregacija proteina. Veličina čestica i zamućenje su ostali relativno konstantni u narednih 10 minuta termičkog tretmana (od 10 do 20 min), što sugeriše da nije bilo dalje promene ove karakteristike čestica.

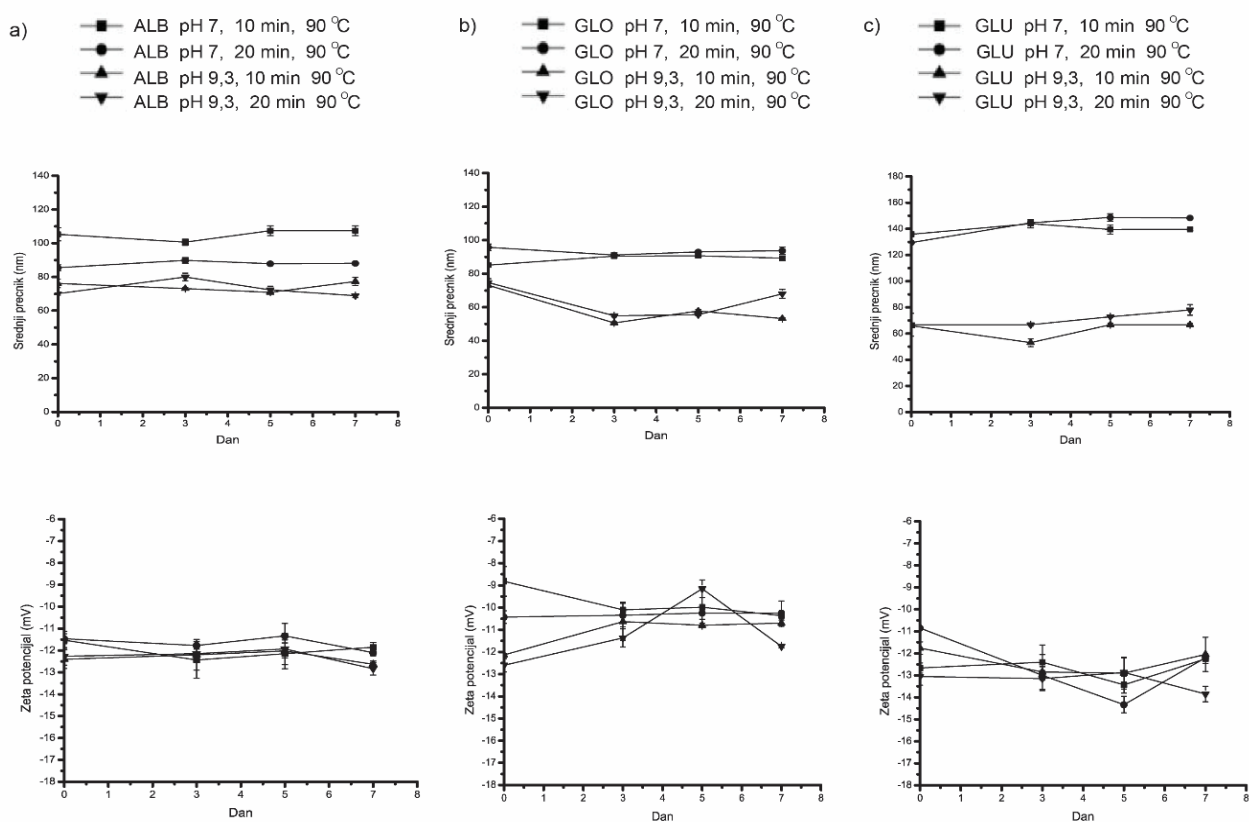
Kao što je već diskutovano, termički tretman je imao efekta na sekundarnu strukturu albuminske, globulinske i glutelinske frakcije leblebije. Generalno, termički tretman je doveo do smanjenja sadržaja β -ravni i β -zavoja, i povećanja sadržaja α -heliksa i nasumičnih kalemova (tabela

22). Poznato je da globulinska frakcija biljnih proteina termostabilnija, odnosno da poseduje višu temperaturu denaturacije u odnosu na druge dve ispitivane frakcije (Gorinstein *et al.*, 1996). Stoga je bilo razumljivo da se izrazitije povećanje sadržaja nasumičnih kalemova, kao razmotanijih oblika sekundarne strukture, dogodilo u albuminskoj i glutelinskoj frakciji.

Kao i kod proteinskih izolata, tako je i kod svih pripremljenih nanočestica iz frakcija proteina leblebije bilo prisutno smanjenje sadržaja β -ravni što se može objasniti njihovim učestvovanjem u formiranju agregata putem stvaranja intermolekularnih β -ravni (Fink, 1998; Nowick, 2008). Kako se one uvek nalaze u unutrašnjosti proteinskog molekula, delimični gubitak strukture β -ravni ukazuje na odvijanje strukture proteina i izlaganje hidrofobnih mesta koja mogu da interaguju jedno sa drugim i izazovu agregaciju (Wang *et al.*, 2014). S tim u vezi, pokazano je da povećanje sadržaja nasumičnih kalemova umnogome doprinosi povećanju hidrofobnosti proteinskih nanočestica (Wang *et al.*, 2011).

4.5.3. Stabilnost proteinskih nanočestica tokom skladištenja

Na osnovu podataka o stabilnosti nanočestica može se pretpostaviti da li će pripremljene nanočestice ostati stabilne ili se degradirati tokom određenog vremena, što je od velike važnosti za njihovu primenu. Da bi se ispitala stabilnost pripremljenih nanočestica, srednji prečnik i zeta potencijal mereni su u periodu od 7 dana tokom skladištenja na 4 °C i dobijeni rezultati su predstavljeni na slici 32.



Slika 32. Srednji prečnik i zeta potencijal proteinskih nanočestica pripremljenih iz a) ALB b) GLO i c) GLU frakcija proteina leblebije, mereni u periodu od 7 dana tokom skladištenja na 4 °C

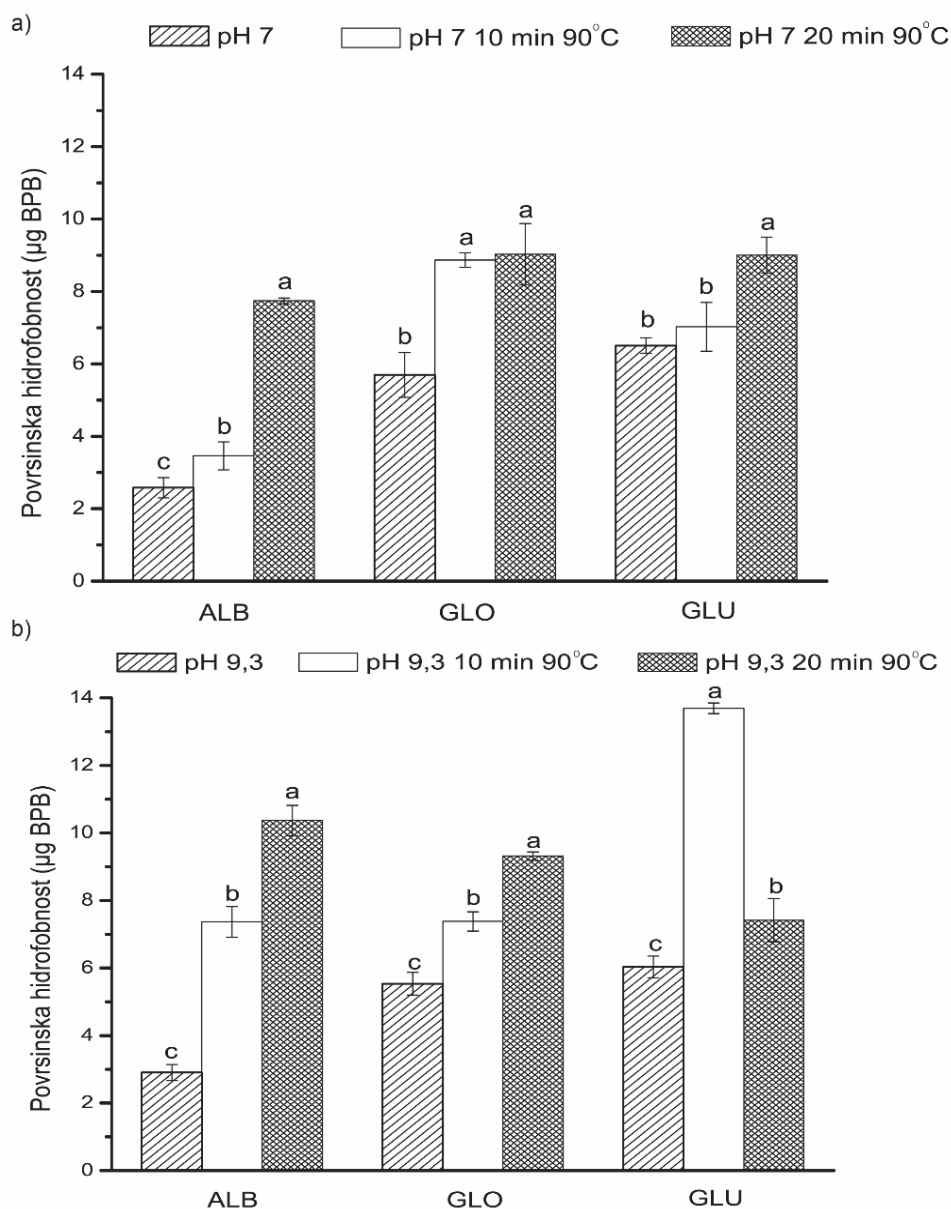
Pri pH 7, nakon 7 dana skladištenja na 4 °C, sve nanočestice pripremljene iz proteinskih frakcija pokazale su postojanu stabilnost i male promene u veličini čestica. Ove promene su bile uočljivije kod nanočestica pripremljenih termičkim tretmanom u trajanju od 20 min nego kod onih dobijenih nakon 10 min zagrevanja. Kod GLO i GLU nanočestica uočeno je povećanje srednjeg prečnika od 5% i 15%, redom, dok kod ALB nanočestica povećanje srednjeg prečnika nije bilo statistički značajno. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa promenama u zeta potencijalu; veoma značajno ($p < 0,01$) povećanje negativnog površinskog naelektrisanja bilo je izmereno za nanočestice iz GLU i GLO frakcija, dok kod ALB nanočestica nije došlo do promena u zeta potencijalu. Povećanje negativnog površinskog naelektrisanja dešava se usled odvijanja proteinskih nanočestica i promena u njihovom srednjem prečniku koji dovode do izlaganja naelektrisanih aminokiselina i s tim povećanja vrednosti zeta potencijala (Fan et al., 2021).

Pri pH 9,3 nisu uočene statistički značajne promene u srednjem prečniku kod ALB i GLU nanočestica dobijenih termičkim tretmanom nakon 10 min i 20 min, što je ukazalo na njihovu veliku stabilnost. Kod GLO proteinske frakcije uočeno je smanjenje srednjeg prečnika od 28% i 10% kod nanočestica pripremljenih zagrevanjem u intervalu od 10 min i 20 min, redom. Ovi rezultati bili su praćeni razlikama u zeta potencijalu; kod GLO nanočestica došlo je do smanjenja negativnog površinskog naelektrisanja, što je bilo u skladu sa pretpostavkom da su stvorene čestice izgubile deo svoje nanostrukture (Freitas and Müller, 1998).

4.5.4. Površinska hidrofobnost proteinskih nanočestica

Pored površinskog naelektrisanja, površinska hidrofobnost proteina takođe predstavlja važan parametar koji utiče na njihovu ukupnu funkcionalnost (Liu and Tang, 2013). Rezultati površinske hidrofobnosti rastvora nativnih frakcija proteina leblebije i pripremljenih nanočestica prikazani su na slici 33. Dobijeni rezultati pokazuju da je površinska hidrofobnost nanočestica iz sve tri ispitivane frakcije nakon termičkog tretmana bila značajno ($p < 0,05$) povećana u poređenju sa netretiranim rastvorima frakcija. Kao što je i ranije napomenuto, termički tretman dovodi do odmotavanja tercijerne strukture i izlaganja hidrofobnih ostataka (koji se generalno nalaze u unutrašnjosti molekula), što posledično utiče na povećanje površinske hidrofobnosti molekula proteina.

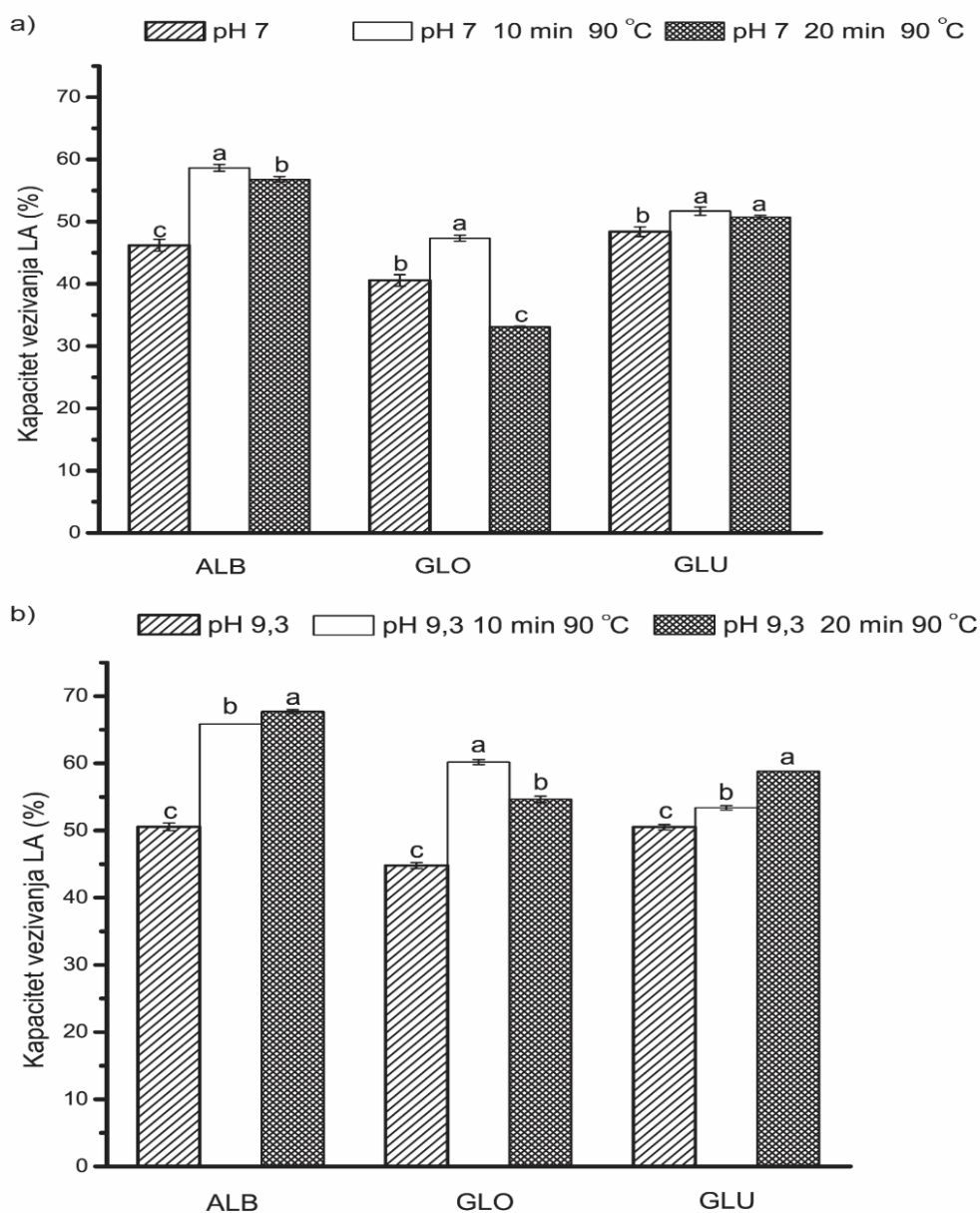
Najveće vrednosti površinske hidrofobnosti dobijene su za nanočestice pripremljene od GLU i ALB na pH 9,3. Ovakvi rezultati mogu se objasniti većom površinskom hidrofobnošću native glutelinske frakcije (slika 26), ali i termičkim tretmanom koji je doprineo razmotavanju strukture proteina ove frakcije, pa time i povećanju ove osobine njihovih površina. Što se tiče albuminske frakcije, uočeno je povećanje sadržaja nasumičnih kalemova kao elemenata sekundarne strukture nakon termičkog tretmana (tabela 22), što je verovatno doprinelo fleksibilnijoj strukturi i većim vrednostima površinske hidrofobnosti kod ovih nanočestica. Povećanje vrednosti površinske hidrofobnosti kod albuminske frakcije u saglasnosti je sa rezultatima Tang et al. (2019) koji su takođe pokazali da se zagrevanjem povećala površinska hidrofobnost albuminske frakcije dobijene iz ljuski pirinča. Već izneta konstatacija da povećanje sadržaja nasumičnih kalemova umnogome doprinosi povećanju hidrofobnosti kod proteinskih nanočestica (Wang et al., 2011) je u saglasnosti sa rezultatima povećanog sadržaja nasumičnih kalemova (tabela 22) sa većom površinskom hidrofobnošću kod pripremljenih nanočestica iz albuminske i glutelinske frakcije.



Slika 33. Površinska hidrofobnost proteinskih nanočestica pripremljenih iz ALB, GLO i GLU leblebije; termički tretman: 90 °C tokom 10 i 20 min na pH 7 i 9,3; Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ($n = 3$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema *Tukey*-ovom testu na nivou $p < 0,05$.

4.5.5. Kapacitet proteinskih nanočestica za vezivanja linolne kiseline

Sposobnost proteina da vezuju različita bioaktivna jedinjenja usko je povezana sa prisustvom hidrofobnih/hidrofilnih regiona na njihovoj površini. Sposobnost nanočestica pripremljenih od frakcija albumina, globulina i glutelina da vežu hidrofobnu linolnu kiselinu je ispitana i dobijeni rezultati su prikazani na slici 34.



Slika 34. Kapaciteti proteinskih nanočestica dobijenih termičkim tretmanom ALB, GLO i GLU leblebije za vezivanje LA; termički tretman: 90 °C tokom 10 i 20 min na pH 7 i 9,3. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ($n = 3$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema *Tukey*-ovom testu na nivou $p < 0,05$.

Sve pripremljene nanočestice su pokazale statistički visoko značajno ($p < 0,001$) povećanje kapaciteta vezivanja LA u poređenju sa netretiranim frakcijama proteina, osim onih pripremljenih iz GLO posle 20 min tretmana na pH 7. Povećani kapacitet vezivanja LA može biti povezan sa činjenicom da tokom termičkog tretmana dolazi do izlaganja hidrofobnih amino kiselina i stvaranja novih mesta za vezivanje različitih bioaktivnih molekula, što je prethodno i pokazano (slika 33).

Najveći kapacitet vezivanja ostvaren je kod nanočestica dobijenih iz ALB frakcije na obe ispitivane pH vrednosti, na pH 7 i 9,3 i to 58 i 67%, redom.

Tabela 23. Parametri veličine nanočestica* i odnos površinska hidrofobnost/površina nanočestica** pripremljenih od ALB, GLO i GLU frakcija proteina leblebije

Frakcija proteina leblebije	A (nm ²)	V (nm ³)	A/V (1/nm)	PH/A (μg BPB/nm ²)
ALB				
pH 7, 10 min, 90 °C	$1,38 \times 10^5$	$60,58 \times 10^4$	0,23	$7,75 \times 10^{-5}$
pH 7, 20 min, 90 °C	$9,07 \times 10^4$	$32,14 \times 10^4$	0,29	$13,09 \times 10^{-5}$
pH 9,3, 10 min, 90 °C	$7,25 \times 10^4$	$22,97 \times 10^4$	0,31	$17,34 \times 10^{-5}$
pH 9,3, 20 min, 90 °C	$6,15 \times 10^4$	$17,95 \times 10^4$	0,34	$23,31 \times 10^{-5}$
GLO				
pH 7, 10 min, 90 °C	$1,18 \times 10^5$	$47,76 \times 10^4$	0,25	$7,02 \times 10^{-5}$
pH 7, 20 min, 90 °C	$1,26 \times 10^5$	$52,33 \times 10^4$	0,24	$8,73 \times 10^{-5}$
pH 9,3, 10 min, 90 °C	$6,33 \times 10^4$	$18,73 \times 10^4$	0,34	$17,83 \times 10^{-5}$
pH 9,3, 20 min, 90 °C	$7,45 \times 10^4$	$23,89 \times 10^4$	0,31	$14,84 \times 10^{-5}$
GLU				
pH 7, 10 min, 90 °C	$3,46 \times 10^5$	$23,94 \times 10^5$	0,14	$2,12 \times 10^{-5}$
pH 7, 20 min, 90 °C	$3,89 \times 10^5$	$28,53 \times 10^5$	0,13	$2,10 \times 10^{-5}$
pH 9,3, 10 min, 90 °C	$5,47 \times 10^4$	$15,04 \times 10^4$	0,36	$15,95 \times 10^{-5}$
pH 9,3 20 min, 90 °C	$5,47 \times 10^4$	$15,04 \times 10^4$	0,36	$12,50 \times 10^{-5}$

* površina – A ; zapremina – V ; odnos površina/zapremina – A/V ;

** odnos površinska hidrofobnost/površina nanočestica – PH/A

S obzirom da se, generalno, moglo zaključiti da se sa povećanjem vrednosti pH na kojoj je vođen tretman povećao i kapacitet nanočestica za vezivanje linolne kiseline, dobijeni rezultati su analizirani i sa aspekta važnih parametara pripremljenih nanočestica (tabela 23). Analiza rezultata je pokazala da se ovaj fenomen može objasniti činjenicom da se na višoj pH vrednosti stvaraju nanočestice manje veličine, za koje je karakterističan veći odnos površine i zapremine; to znači da je odnos površinske hidrofobnosti i površine za nanočestice manje veličine/zapremine veći nego za nanočestice većih dimenzija (*Sponton et al.*, 2017), što se može videti i iz brojnih vrednosti za V i PH/A . Rezultati za parametre veličine nanočestica, kao i odnosa njihove hidrofobnosti i površine su bili konzistentni sa onima za vezivanje LA; pokazalo se, naime, da su nanočestice pripremljene termičkim tretmanom albuminske frakcije na pH 9,3, koje su imale najveći PH/A , imale i najveći kapacitet vezivanja linolne kiseline.

4.5.6. Kapacitet proteinskih nanočestica za vezivanja askorbinske kiseline

Proteinske nanočestice mogu se koristiti kao sistemi koji će omogućiti efikasnu isporuku bioaktivnih jedinjenja i postići povećanje njihove biodostupnosti. Askorbinska kiselina, kao primer hidrofilnog bioaktivnog jedinjenja, široko je poznata po svojim izrazitim antioksidativnim svojstvima. U ekperimentima su korišćene nanočestice koje su imale najveće (pH 7, 10 min, 90 °C) i najmanje (pH 9,3 10 min, 90 °C) dimenzije, kao i odgovarajuće frakcije proteina leblebije u nativnom stanju. Rezultati konstanti vezivanja frakcija proteina leblebije i od njih pripremljenih nanočestica za askorbinsku kiselinu prikazani su u tabeli 24.

Tabela 24. Konstante vezivanja nanočestica dobijenih termičkim tretmanom frakcija proteina leblebije za askorbinsku kiselinu

	Konstanta vezivanja (l/mol)		
	ALB	GLO	GLU
pH 7	$6,14 \times 10^1$	$9,57 \times 10^1$	$5,08 \times 10^1$
pH 7, 10 min, 90 °C	$4,00 \times 10^1$	$7,24 \times 10^1$	$4,35 \times 10^1$
pH 9,3	$1,62 \times 10^2$	$5,82 \times 10^1$	$1,15 \times 10^1$
pH 9,3, 20 min, 90 °C	$1,03 \times 10^2$	$1,26 \times 10^2$	$3,76 \times 10^1$

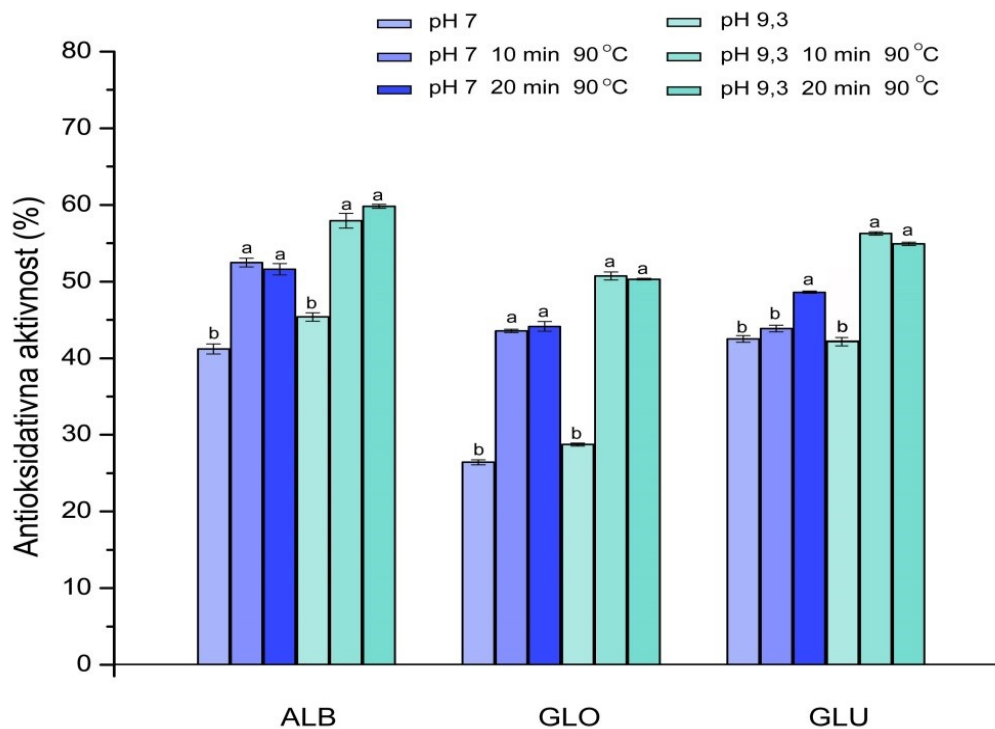
Uslovi termičkog tretmana: 90 °C tokom 10 i 20 min na pH 7 i 9,3.

Iz poređenja konstanti vezivanja frakcija proteina leblebije i odgovarajućih nanočestica pripremljenih termičkim tretmanom može se zaključiti da je primenjeni protokol, generalno, izazvao smanjenje ovog parametra vezivanja askorbinske kiseline. Objašnjenje se može pronaći u činjenici da je termički tretman produkovao proteinske nanočestice sa većom hidrofobnošću po jedinici površine u odnosu na nativne frakcije, što je moglo negativno da se odrazi na vezivanje hidrofilnog jedinjenja kakvo je askorbinska kiselina. U tom smislu su, može se sa sigurnošću pretpostaviti, konformacione promene u strukturi proteina, koje su odgovorne za povećanje hidrofobnosti površine, uzrokovale smanjeno vezivanje askorbinske kiseline. Istovremeno, manje vrednosti hidrofobnosti površine izmerene za GLO nanočestice verovatno su bile odgovorne za veću konstantu vezivanja askorbinske (a takođe i manji kapacitet vezivanja linolne kiseline), u odnosu na nanočestice pripremljene iz druge dve frakcije proteina leblebije.

Treba, takođe, primetiti da su nanočestice pripremljene iz sve tri frakcije proteina leblebije imale niže konstante vezivanja askorbinske kiseline na višoj pH vrednosti termičkog tretmana, što je u skladu sa diskusijom ne samo o uticaju hidrofobnosti, već i veličine nanočestica, odnosno odnosa PH/A (slika 33 i tabela 23).

4.5.7. *In vitro* antioksidativna aktivnost proteinskih nanočestica

Antioksidativna svojstva različitih nanostrukture trenutno se intenzivno proučavaju u cilju otkrivanja njihovih pozitivnih efekata na ljudsko zdravlje (Samrot et al., 2022). Rezultati *in vitro* antioksidativne aktivnosti nanočestica pripremljenih od frakcija albumina, globulina i glutelina leblebije, uporedo sa aktivnošću nativnih rastvora prikazani su na slici 35.



Slika 35. *In vitro* antioksidativna aktivnost proteinskih nanočestica pripremljenih iz ALB, GLO i GLU frakcija leblebije određena ABTS testom. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija ($n = 3$). Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike određene prema Tukey-ovom testu na nivou $p < 0,05$.

Dobijeni rezultati su pokazali da je termički tretman značajno doprineo povećanju antioksidativnog potencijala svih pripremljenih nanočestica, ocenjenog njihovom sposobnošću da uklone $ABTS^{+\cdot}$ radikale. Nanočestice su pokazale povećanje antioksidativne aktivnosti od 14% do 67% pri pH 7, i od 26% do 75% pri pH 9,3 u poređenju sa odgovarajućim proteinskim frakcijama koje nisu bile podvrgnute termičkom tretmanu. Nakon termičkog tretmana, antioksidativna aktivnost je blago porasla kod albuminskih i glutelinskih nanočestica, dok je povećanje bilo uočljivije i intenzivnije kod globulinskih nanočestica. Dobijeni rezultati povećane antioksidativne aktivnosti nanočestica mogu biti objašnjeni povećanjem površinske hidrofobnosti nakon termičkog tretmana koje može biti odgovorno za ostvarivanje hidrofobnih interakcija, čime se, prema literaturnim podacima, olakšava njihova interakcija sa slobodnim radikalima i omogućava uklanjanje ovih reaktivnih vrsta (Yuan *et al.*, 2018; Zou *et al.*, 2016).

Ipak, generalno gledano, albuminska frakcija proteina leblebije dala je nanočestice sa najvećom antioksidativnom aktivnošću; ova frakcija je i u nativnom stanju pokazala najveću sposobnost uklanjanja $ABTS^{+\cdot}$ radikala (slika 23) što se može objasniti najvećom rastvorljivošću ove frakcije, kao važnog svojstva u pogledu omogućavanja kontakta i interakcije između antioksidanta i reaktivnih radikalskih vrsta (Zou *et al.*, 2016).

5. Zaključci

Iz istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije proistekli su sledeći zaključci:

- ❖ Enzimi za razgradnju ćelijskog zida biljaka, koji su pojedinačno ili u različitim kombinacijama testirani u tretmanu obezmašćenog semena leblebije pre alkalne ekstrakcije, omogućili su značajno povećanje koncentracije proteina leblebije u ekstraktu, u odnosu na alkalnu i kontrolnu ekstrakciju. Među njima, najveće vrednosti merenog pokazatelja efikasnosti pretretmana ostvarene su u ARA, (X+C) i X ekstrakcijama, sa značajnom razlikom u odnosu na ALK i K ekstrakcije.
- ❖ Alkalnim postupkom ekstrahovano je približno dve trećine ukupnih proteina iz obezmašćene leblebije, odnosno njegova efikasnost je iznosila 68%. Kada je primenjen enzimski pretretman, bez obzira da li je korišćena pojedinačna arabinofuranozidaza ili kombinacija celulaza i ksilanaze, došlo je do skoro potpune ekstrakcije proteina iz obezmašćene leblebije, što je rezultiralo efikasnošću ekstrakcije iznad 90% u oba slučaja. Enzimski pretretman omogućio je veoma značajno poboljšanje prinosa proteina i efikasnosti ekstrakcije za više od 25% u poređenju sa samom alkalnom ekstrakcijom.
- ❖ Na osnovu FTIR analize zaključeno je da su postojale značajne razlike među ALK-, ARA- i (X+C)-proteinskim izolatima koje su se najviše odnosile na sadržaj α -heliksa i β -ravni/ β -zavoja; naime udeo α -heliksa u sekundarnoj strukturi proteina bio je veći u ARA- i (X+C)-izolatima i, suprotno, udeo β -ravni bio je veći u sekundarnoj strukturi ALK izolata. Ove razlike mogu ukazivati na različit sastav izolata u smislu odnosa između albumina, globulina i glutelina u njima, kao rezultata različitih protokola ekstrakcije. FTIR analiza frakcija proteina pokazala je da je u albuminskoj i globulinskoj frakciji proteina leblebije bio dominantan udeo β -ravni dok je glutelinska frakcija sadržala veći procenat nasumičnih kalemova i α -heliksa u odnosu na druge dve. Stoga su rezultati FTIR analize proteinskih izolata dobijenih iz enzimski potpomognutih ekstrakcija bili konzistentni sa rezultatima FTIR analize frakcija proteina i pretpostavkom da je u izolatima dobijenim u enzimima potpomognutim ekstrakcijama bio povećan udeo glutelinske frakcije.
- ❖ SDS PAGE je pokazala sličan proteinski profil ALK-, ARA- i (X+C)-izolata sa trakama karakterističnim za proteine leblebije, s tom razlikom da je u izolatima dobijenim u ekstrakcijama potpomognutim enzimima proteinska traka na ~55 kDa bila izraženija u poređenju sa izolatom iz alkalne ekstrakcije. Ova proteinska traka se može pripisati jednoj od podjedinica glutelina, čije izraženije je prisustvo bilo omogućeno poboljšanim oslobađanjem ove frakcije iz kotiledona i omotača semena leblebije primenom enzima. Pretpostavka o većem prisustvu glutelinske frakcije u izolatima dobijenim ekstrakcijama potpomognutim enzimima potvrđena je rezultatima analize elektroforetskih profila frakcija proteina leblebije; oni su pokazali da je za ALB frakciju bilo karakteristično postojanje traka manjih molekulskih masa od ~7 i ~25 kDa, GLO frakciju postojanje najintenzivnijih traka sa molekulskim masama od 20 kDa i 35 kDa, dok je traka na ~55 kDa u glutelina leblebije predstavljala tipičnu podjedinicu ove frakcije.
- ❖ Rezultati aminokiselinskog sastava su pokazali da su u svim proteinskim izolatima leblebije dominantno bile prisutne glutaminska i asparaginska kiselina, dok su sledeće po

zastupljenosti bile arginin i leucin. Enzimski tretman doveo je do veoma značajnog povećanja sadržaja tirozina i smanjenja sadržaja glutaminske kiseline i valina u enzimski ekstrahovanim proteinskim izolatima u odnosu na alkalni izolat. Ovi rezultati su bili u dobroj saglasnosti sa rezultatima analize aminokiselinskog sastava frakcija proteina; naime sve frakcije su imale najveći sadržaj glutaminske i asparaginske kiseline. Takođe, značajno veći sadržaj tirozina u izolatima iz enzima potpomognutih ekstrakcija je bio u dobroj saglasnosti sa značajno većim sadržajem ove aminokiseline u glutelinskoj frakciji proteina leblebije u odnosu na druge dve frakcije proteina.

- ❖ Primena individualne arabinofuranozidaze i kombinacije celulaza i ksilanaze u tretmanima koje su prethodili alkalnoj ekstrakciji povećala je rastvorljivost proteinskih izolata u poređenju sa izolatom iz alkalne ekstrakcije. Veće vrednosti WHC-a i OHC-a, bolje emulgujuće karakteristike i svojstva penjenja su takođe dobijene za ARA- i (X+C)-izolate u odnosu na ALK izolat. S druge strane, funkcionalne osobine frakcija proteina su pokazale dobro slaganje superiornijih rezultata kapaciteta zadržavanja vode i ulja, emulgujućih osobina i svojstva penjenja kod glutelinske frakcije (u odnosu na druge dve frakcije) sa rezultatima za ova svojstva proteinskih izolata. Ovo je predstavljalo još jedan pokazatelj da su proteinski izolati dobijeni alkalnom ekstrakcijom nakon enzimskog pretretmana ispoljili superiornije funkcionalne osobine zbog povećanog udela glutelina u njima.
- ❖ Pored poboljšanja funkcionalnih osobina, enzimski pretretman je veoma značajno povećao antioksidativni potencijal alkalnog proteinskog izolata meren njegovom sposobnošću da ukloni $ABTS^{+}$ radikale. Pretretman arabinofuranozidazom, i kombinacijom celulaza i ksilanaze poboljšao je *in vitro* antioksidativnu aktivnost alkalnog izolata za 70%, odnosno više od 100%, redom. S druge strane, analiza *in vitro* antioksidativne aktivnosti frakcija proteina leblebije pokazala je da je albuminska frakcija ispoljila najveću a globulinska najmanju sposobnost uklanjanja $ABTS^{+}$ radikala. Dobijeni rezultati mogu biti objašnjeni činjenicom da neke osobine proteinskog izolata mogu predstavljati složenu a ne jednostavnu zbirnu funkciju pojedinačnih svojstava proteinskih frakcija, pa tako i svojstva proteinskih izolata mogu biti bolja od zbira doprinosa pojedinačnih frakcija koje se u njima nalaze.
- ❖ Preparativnom hromatografijom sa hidrofobnim interakcijama razdvojeni su proteini ARA-izolata leblebije. Analiza elemenata sekundarne strukture proteina eluiranih u gradijentnim koracima je pokazala da je najveći sadržaj β -ravni bio u onim frakcijama koje su poslednje eluirane sa kolone, i obrnuto. Proteinski profili eluiranih frakcija su potvrdili da su, u primenjenim uslovima, frakcije relativno najveće hidrofobnosti imale proteinske trake na ~70 kDa, kao podjedinice globulina leblebije, i trake nižih molekulskih masa, kao proteina albuminske frakcije, koje nisu bile uočene u drugim frakcijama. Hidrofobnije frakcije su takođe ispoljile veću *in vitro* antioksidativnu aktivnost u odnosu na ostale, što je u saglasnosti sa pretpostavkom da jače hidrofobne interakcija poboljšavaju kontakt sa slobodnim radikalima i olakšavaju njihovo uklanjanje.
- ❖ Najmanje nanočestice pripremljene su od proteinskog izolata dobijenog iz alkalne ekstrakcije potpomognute kombinacijom celulaza i ksilanaze, pri većoj ispitivanoj vrednosti pH. Ove nanočestice pokazale su i bolju stabilnost tokom skladištenja i veću antioksidativnu aktivnost

u odnosu na nanočestice pripremljene od alkalnog izolata. Proteinski izolat ekstrahovan uz pomoć arabinofuranozidaze omogućio je pripremu nanočestica sa najvećim kapacitetom vezivanja linolne kiseline na obe ispitivane pH. Rezultati karakteristika nanostrukture dobijenih iz frakcija proteina leblebije su pokazali da nanočestice dobijene od glutelinske frakcije poseduju najmanju veličinu nanočestica, veliku stabilnost tokom skladištenja kao i visoku *in vitro* antioksidativnu aktivnost. Primećeno je dobro slaganje superiornijih rezultata nanočestica pripremljenih iz glutelinske frakcije sa rezultatima za ova svojstva nanočestica pripremljenih od proteinskih izolata iz enzimima potpomognutih ekstrakcija, što je u skladu sa pretpostavkom da je u njima prisutan veći udeo glutelina. Dodatno, nanočestice pripremljene od albuminske frakcije pokazale su generalno veći kapacitet vezivanja linolne kiseline, kao složene funkcije veličine i površinske hidrofobnosti, u odnosu na nanočestice iz druge dve frakcije, uz takođe izraženu *in vitro* antioksidativnu aktivnost.

6. Literatura

- AACC, Approved Methods of Analysis, 1999a. Method 32-05.01: Total Dietary Fiber. Cereals and Grains Association, 1–4. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1094/AACCIntMethod-32-05.01>
- AACC, Approved Methods of Analysis, 1999b. Method 76-13.01: Total Starch Assay Procedure (Megazyme Amyloglucosidase/ α -Amylase Method). Cereals and Grains Association, 1–6. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1094/AACCIntMethod-76-13.01>
- Abdelsalam, A.M., Somaida, A., Ayoub, A.M., Alsharif, F.M., Preis, E., Wojcik, M., Bakowsky, U., 2021. Surface-tailored zein nanoparticles: Strategies and applications. *Pharmaceutics* 13, 1354. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091354>
- Abugoch, L.E., Martínez, E.N., Añón, M.C., 2003. Influence of the extracting solvent upon the structural properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) glutelin. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4060–4065. <https://doi.org/10.1021/jf025949e>
- Adebiyi, A.P., Adebiyi, A.O., Ogawa, T., Muramoto, K., 2007. Preparation and characterization of high-quality rice bran proteins. *J. Sci. Food Agric.* 87, 1219–1227. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2819>
- Agboola, S., Ng, D., Mills, D., 2005. Characterisation and functional properties of Australian rice protein isolates. *J. Cereal Sci.* 41, 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.10.007>
- Ajibola, C.F., Malomo, S.A., Fagbemi, T.N., Aluko, R.E., 2016. Polypeptide composition and functional properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) albumin, globulin and protein concentrate. *Food Hydrocoll.* 56, 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.12.013>
- Akasha, I.A.M., 2014. Extraction and Characterisation of Protein Fraction from Date Palm. *World Acad. Sci. Eng. Technol* 6, 875–877.
- Akharume, F., Santra, D., Adedeji, A., 2020. Physicochemical and functional properties of proso millet storage protein fractions, *Food Hydrocoll.* 108, 105497. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105497>
- Akharume, F.U., Aluko, R.E., Adedeji, A.A., 2021. Modification of plant proteins for improved functionality: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 20, 198–224. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12688>
- Alajaji, S.A., El-Adawy, T.A., 2006. Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. *J. Food Compos. Anal.* 19, 806–812. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.03.015>
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2014. Protein Structure and Function. In Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (4th ed.) *Essential Cell Biology*. W.W. Norton & Company. <https://doi.org/10.1201/9781315815015>
- Aluko, R.E., Mofolasayo, O.A., Watts, B.M., 2009. Emulsifying and foaming properties of commercial yellow pea (*Pisum sativum* L.) seed flours. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9793–9800. <https://doi.org/10.1021/jf902199x>
- Amagliani, L., Silva, J.V.C., Saffon, M., Dombrowski, J., 2021. On the foaming properties of plant proteins: Current status and future opportunities. *Trends Food Sci. Technol.* 118, 261–272. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.10.001>

- Ariyaratna, I.R., Nedra Karunaratne, D., 2015. Use of chickpea protein for encapsulation of folate to enhance nutritional potency and stability. *Food Bioprod. Process.* 95, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.04.004>
- Asadi, M., Salami, M., Hajikhani, M., Emam-Djomeh, Z., Aghakhani, A., Ghasemi, A., 2021. Electrospray Production of Curcumin-walnut Protein Nanoparticles. *Food Biophys.* 16, 15–26. <https://doi.org/10.1007/s11483-020-09637-9>
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* 23, 257–270. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90074-J](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90074-J)
- Bengoechea, C., Peinado, I., McClements, D.J., 2011. Formation of protein nanoparticles by controlled heat treatment of lactoferrin: Factors affecting particle characteristics. *Food Hydrocoll.* 25, 1354–1360. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.014>
- Beveridge, T., Toma, S. J., Nakai, S., 1974. Determination of SH and S-S groups in some food proteins using Ellman's reagent. *J. Food Sci.* 39, 49–51. <https://doi.org/10.1111/jfds.1974.39.issue-110.1111/j.1365-2621.1974.tb00984.x>
- Bhagyawant, S.S., Srivastava, N., 2015. *Plant Biotechnology*. Horizon Books.170
- Bhushani, J.A., Kurrey, N.K., Anandharamakrishnan, C., 2017. Nanoencapsulation of green tea catechins by electrospraying technique and its effect on controlled release and in-vitro permeability. *J. Food Eng.* 199, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.12.010>
- Bildstein, M., Lohmann, M., Hennigs, C., Krause, A., Hilz, H., 2008. An enzyme-based extraction process for the purification and enrichment of vegetable proteins to be applied in bakery products. *Eur. Food Res. Technol.* 228, 177–186. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0921-z>
- Boukid, F., 2021. Chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein as a prospective plant-based ingredient: a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 56, 5435–5444. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15046>
- Boulter, D., 1983. Protein composition of grains of the Leguminosae. *Plant Foods Hum. Nutr.* 32, 247–252.
- Boye, J., Zare, F., Pletch, A., 2010a. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Res. Int.* 43, 414–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>
- Boye, J.I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., Rajamohamed, S.H., 2010b. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Res. Int.* 43, 537–546. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.021>
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brummer, Y., Kaviani, M., Tosh, S.M., 2015. Structural and functional characteristics of dietary fibre in beans, lentils, peas and chickpeas. *Food Res. Int.* 67, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.009>
- Calicioglu, O., Flammini, A., Bracco, S., Bellù, L., Sims, R., 2019. The future challenges of food and agriculture: An integrated analysis of trends and solutions. *Sustain.* 11, 222.

<https://doi.org/10.3390/su11010222>

- Carbonaro, M., Maselli, P., Nucara, A., 2015. Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Res. Int.* 76, 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.007>
- Carbonaro, M., Maselli, P., Nucara, A., 2012. Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: A Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study. *Amino Acids* 43, 911–921. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1151-4>
- Carbonaro, M., Nucara, A., 2010. Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. *Amino Acids* 38, 679–690. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0274-3>
- Champ, M., Brillouet, J.M., Rouau, X., 1986. Nonstarchy Polysaccharides of *Phaseolus vulgaris*, *Lens esculenta*, and *Cicer arietinum* Seeds. *J. Agric. Food Chem.* 34, 326–329. <https://doi.org/10.1021/jf00068a044>
- Chang, L., Lan, Y., Bandillo, N., Ohm, J.B., Chen, B., Rao, J., 2022. Plant proteins from green pea and chickpea: Extraction, fractionation, structural characterization and functional properties. *Food Hydrocoll.* 123, 107165. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107165>
- Chang, Y.W., 2006. Isolation and characterization of proteins from chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. McGill University
- Chang, Y., 2010. Isolation and characterization of protein fractions from chickpea (*Cicer arietinum* L.) and oat (*Avena sativa* L.) seeds using proteomic techniques. McGill University.
- Chang, Y.W., Alli, I., Konishi, Y., Ziomek, E., 2011. Characterization of protein fractions from chickpea (*Cicer arietinum* L.) and oat (*Avena sativa* L.) seeds using proteomic techniques. *Food Res. Int.* 44, 3094–3104. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.001>
- Chang, Y.W., Alli, I., Molina, A.T., Konishi, Y., Boye, J.I., 2012. Isolation and Characterization of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Seed Protein Fractions. *Food Bioprocess Technol.* 5, 618–625. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0303-y>
- Chavan, J.K., Kadam, S.S., Salunkhe, D.K., 1987. Biochemistry and technology of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *C R C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 25, 107–158. <https://doi.org/10.1080/10408398709527449>
- Chelh, I., Gatellier, P., Santé-Lhoutellier, V., 2006. Technical note: A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination. *Meat Sci.* 74, 681–683. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.05.019>
- Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Nokihara, K., 1996. Antioxidant Activity of Designed Peptides Based on the Antioxidative Peptide Isolated from Digests of a Soybean Protein. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2619–2623. <https://doi.org/10.1021/jf950833m>
- Chen, L., Remondetto, G.E., Subirade, M., 2006. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 272–283. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.011>
- Chen, X., McClements, D.J., Wang, J., Zou, L., Deng, S., Liu, W., Yan, C., Zhu, Y., Cheng, C., Liu, C., 2018. Coencapsulation of (-)-Epigallocatechin-3-gallate and Quercetin in Particle-Stabilized W/O/W Emulsion Gels: Controlled Release and Bioaccessibility. *J. Agric. Food Chem.* 66,

3691–3699. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05161>

- Chen, Y.B., Zhu, X.F., Liu, T.X., Lin, W.F., Tang, C.H., Liu, R., 2019. Improving freeze-thaw stability of soy nanoparticle-stabilized emulsions through increasing particle size and surface hydrophobicity. *Food Hydrocoll.* 87, 404–412. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.020>
- Choi, S.M., Ma, C.Y., 2007. Structural characterization of globulin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) using circular dichroism and Raman spectroscopy. *Food Chem.* 102, 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.011>
- Clemente, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Bautista, J., Millán, F., 2000. Factors affecting the in vitro protein digestibility of chickpea albumins. *J. Sci. Food Agric.* 80, 79–84. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(2000101\)80:1<79::AID-JSFA487>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(2000101)80:1<79::AID-JSFA487>3.0.CO;2-4)
- Cobos, M.J., Izquierdo, I., Sanz, M.A., Tomás, A., Gil, J., Flores, F., Rubio, J., 2016. Genotype and environment effects on sensory, nutritional, and physical traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Spanish J. Agric. Res.* 14, e0709. <https://doi.org/10.5424/sjar/2016144-8719>
- Conde, J.M., Escobar, M.D.M.Y., Pedroche Jiménez, J.J., Rodríguez, F.M., Rodríguez Patino, J.M., 2005. Effect of enzymatic treatment of extracted sunflower proteins on solubility, amino acid composition, and surface activity. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8038–8045. <https://doi.org/10.1021/jf051026i>
- Cui, Q., Ni, X., Zeng, L., Tu, Z., Li, J., Sun, K., Chen, X., Li, X., 2017. Optimization of Protein Extraction and Decoloration Conditions for Tea Residues. *Hortic. Plant J.* 3, 172–176. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.06.003>
- Da Silva, M., Neves, V., Lourenço, E., 2001. Protein Fractions and Major Globulin from Chickpea (*Cicer Arietinum* L.). *Alimentos E Nutrição.* 12, 131–149.
- Damodaran, S., Paraf, A., 1997. *Food proteins and their applications*, CRC Press, 694. <https://doi.org/10.1201/9780203755617>
- De Frates, K., Markiewicz, T., Gallo, P., Rack, A., Weyhmiller, A., Jarmusik, B., Hu, X., 2018. Protein polymer-based nanoparticles: Fabrication and medical applications. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms19061717>
- Deak, N.A., Johnson, L.A., 2007. Effects of extraction temperature and preservation method on functionality of soy protein. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84, 259–268. <https://doi.org/10.1007/s11746-007-1035-7>
- Dhawan, K., Malhotra, S., Dahiya, B.S., Singh, D., 1991. Seed protein fractions and amino acid composition in gram (*Cicer arietinum*). *Plant Foods Hum Nutr.* 41, 225–232. <https://doi.org/10.1007/BF02196390>
- Drulyte, D., Orlien, V., 2019. The Effect of Processing on Digestion of Legume Proteins. *Foods* 8, 224. <https://doi.org/10.3390/foods8060224>
- Du, Y., Jiang, Y., Zhu, X., Xiong, H., Shi, S., Hu, J., Peng, H., Zhou, Q., Sun, W., 2012a. Physicochemical and functional properties of the protein isolate and major fractions prepared from *Akebia trifoliata* var. *australis* seed. *Food Chem.* 133, 923–929. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.005>
- Du, Y., Shi, S., Jiang, Y., Xiong, H., Woo, M.W., Zhao, Q., Bai, C., Zhou, Q., Sun, W., 2012b.

- Physicochemical properties and emulsion stabilization of rice dreg glutelin conjugated with κ -carrageenan through Maillard reaction. *J. Sci. Food Agric.* 93, 125–133.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.5739>
- Duranti, M., Scarafoni, A., 1999. Modification of Storage Protein Content and Quality in Legume Seeds. *J. New Seeds* 1, 17–35. https://doi.org/10.1300/J153v01n01_03
- Edelman, R., Engelberg, S., Fahoum, L., Meyron-Holtz, E.G., Livney, Y.D., 2019. Potato protein-based carriers for enhancing bioavailability of astaxanthin. *Food Hydrocoll.* 96, 72–80.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.058>
- Elharadallou, S.B., Khalid, I.I., Gobouri, A.A., Abdel-Hafez, S.H., 2015. Amino Acid Composition of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) Flour and Its Protein Isolates. *Food Nutr. Sci.* 6, 790–797. <https://doi.org/10.4236/fns.2015.69082>
- Elias, R.J., Kellerby, S.S., Decker, E.A., 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 430–441. <https://doi.org/10.1080/10408390701425615>
- Espinosa-Ramírez, J., Serna-Saldívar, S.O., 2019. Wet-milled chickpea coproduct as an alternative to obtain protein isolates. *Lwt* 115, 108468. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108468>
- Fan, Y., Peng, G., Pang, X., Wen, Z., Yi, J., 2021. Physicochemical, emulsifying, and interfacial properties of different whey protein aggregates obtained by thermal treatment. *LWT.* 149, 111904. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111904>
- Fang, B., Zhang, M., Tian, M., Ren, F.Z., 2015. Self-assembled β -lactoglobulin-oleic acid and β -lactoglobulin-linoleic acid complexes with antitumor activities. *J. Dairy Sci.* 98, 2898–2907.
<https://doi.org/10.3168/jds.2014-8993>
- FAOSTAT, 2020. *FAO statistical databases*. Dostupno na: <http://faostat.fao.org/>. Pristupljeno dana: 26 Oktobar, 2022.
- Faridy, J.C.M., Stephanie, C.G.M., Gabriela, M.M.O., Cristian, J.M., 2020. Biological Activities of Chickpea in Human Health (*Cicer arietinum* L.). A Review. *Plant Foods Hum. Nutr.* 75, 142–153. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00814-2>
- Fathi, M., Donsi, F., McClements, D.J., 2018. Protein-Based Delivery Systems for the Nanoencapsulation of Food Ingredients. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17, 920–936.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12360>
- Fernández-Quintela, A., Macarulla, M.T., Del Barrio, A.S., Martínez, J.A., 1997. Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods Hum. Nutr.* 51, 331–341. <https://doi.org/10.1023/A:1007936930354>
- Ferrado, J.B., Perez, A.A., Visentini, F.F., Islan, G.A., Castro, G.R., Santiago, L.G., 2019. Formation and characterization of self-assembled bovine serum albumin nanoparticles as chrysin delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 173, 43–51.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.046>
- Ferreira, L., Thais C., B.-O., Pinho, S., 2022. Emulsion-filled gels of soy protein isolate for vehiculation of vitamin D3: Effect of protein solubility on their mechanical and rheological characteristics. *Food Biosci.* 45, 101455.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101455>

- Fink, A.L., 1998. Protein aggregation: Folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold. Des.* 3, 9–23. [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(98\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(98)00002-9)
- Freitas, C., Müller, R.H., 1998. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN®) dispersions. *Int. J. Pharm.* 168, 221–229. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00092-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00092-1)
- Friedman, M., 1999. Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3457–3479. <https://doi.org/10.1021/jf990080u>
- Gao, Z., Shen, P., Lan, Y., Cui, L., Ohm, J.B., Chen, B., Rao, J., 2020. Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea protein isolate. *Food Res. Int.* 131, 109045. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109045>
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., Delie, F., 2008. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.08.001>
- Genovese, M.I., Lajolo, F.M., 1998. Influence of naturally acid-soluble proteins from beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on in vitro digestibility determination. *Food Chem.* 62, 315–323. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00224-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00224-0)
- German, J.B., O'Neill, T.E., Kinsella, J.E., 1983. Film forming and foaming behavior of food proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62, 1358–1366. <https://doi.org/10.1007/BF02545958>
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59, 257–268. <https://doi.org/https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
- Ghribi, A.M., Maklouf, I., Blecker, C., Attia, H., BESBES, S., 2015. Nutritional and Compositional Study of Desi and Kabuli Chickpea (*Cicer Arietinum* L.) Flours from Tunisian Cultivars. *Adv. Food Technol. Nutr. Sci. - Open J.* 1, 38–47. <https://doi.org/10.17140/aftnsoj-1-107>
- Gorinstein, S., Zemser, M., Friedman, M., Rodrigues, W.A., Martins, P.S., Vello, N.A., Tosello, G.A., Paredes-López, O., 1996. Physicochemical characterization of the structural stability of some plant globulins. *Food Chem.* 56, 131–138. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00144-1](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00144-1)
- Gueguen, J., Cerletti, P. 1994. Proteins of some legume seeds: soybean, pea, fababean and lupin. In Hudson, B.J.F. (eds) *New and Developing Sources of Food Proteins*. Springer, 145–193. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2652-0_6
- Güell, C., Ferrando, M., Trentin, A., Schroën, K., 2017. Apparent interfacial tension effects in protein stabilized emulsions prepared with microstructured systems. *Membranes (Basel)*. 7, 19. <https://doi.org/10.3390/membranes7020019>
- Gupta, S., Gupta, D.S., Kumar, J., 2021. Breeding for Enhanced Nutrition Status in Food Legumes: Retrospects and Prospects, in: Gupta, D.S., Gupta, S., Kumar, J. (Ed.), *Breeding for Enhanced Nutrition and Bio-Active Compounds in Food Legumes*. Springer. 1, 1–15. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-59215-8>
- Hall, A.E., Moraru, C.I., 2021. Structure and function of pea, lentil and faba bean proteins treated by high pressure processing and heat treatment. *LWT* 152, 112349. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112349>
- Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A., Fenelon, M., Tiwari, B., 2017. Future Protein Supply and

- Demand: Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium. *Foods* 6, 53. <https://doi.org/10.3390/foods6070053>
- Herman, E.M., Larkins, B.A., 1999. Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell*. 11, 601–613. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.601>
- Hettiarachchy, N.S., 1994. Protein functionality in food systems, *Food Res. Int.* 29, 695. [https://doi.org/10.1016/s0963-9969\(97\)89649-4](https://doi.org/10.1016/s0963-9969(97)89649-4)
- Hirdyani, H., 2015. Nutritional composition of Chickpea (*Cicerarietinum-l*) and value added products. *Indian J. Community Heal.* 26, 102–106.
- Ho, K.K.H.Y., Schroën, K., San Martín-González, M.F., Berton-Carabin, C.C., 2017. Physicochemical stability of lycopene-loaded emulsions stabilized by plant or dairy proteins. *Food Struct.* 12, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2016.12.001>
- Hong, S., Choi, D.W., Kim, H.N., Park, C.G., Lee, W., Park, H.H., 2020. Protein-based nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmaceutics* 12, 604. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070604>
- 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>
- Hui, Y.H., 2006. *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering*. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Iqbal, A., Ateeq, N., Khalil, I.A., Perveen, S., Saleemullah, S., 2006. Physicochemical characteristics and amino acid profile of chickpea cultivars grown in Pakistan. *J. Foodserv.* 17, 94–101. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4506.2006.00024.x>
- Jahanshahi, M., Mehravar, R., 2009. Protein Nanoparticles as a Novel System for Food Science and Technology. In: Jahanshahi, M. (ed) *Nanotechnology I. Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology* 3, 1-1.
- Jain, A., Singh, S.K., Arya, S.K., Kundu, S.C., Kapoor, S., 2018. Protein Nanoparticles: Promising Platforms for Drug Delivery Applications. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4, 3939–3961. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01098>
- Jamet, E., Canut, H., Boudart, G., Pont-Lezica, R.F., 2006. Cell wall proteins: A new insight through proteomics. *Trends Plant Sci.* 11, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.006>
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y.S., Dufresne, Alain Danquah, A., K., M., 2018. Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J. Nanotechnol.* 9, 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>
- Ji, Y.Y., Li, Y.Q., 2010. The role of secondary structure in protein structure selection. *Eur. Phys. J. E* 32, 103–107. <https://doi.org/10.1140/epje/i2010-10591-5>
- Jiang, Z. qing, Sontag-Strohm, T., Salovaara, H., Sibakov, J., Kanerva, P., Loponen, J., 2015. Oat protein solubility and emulsion properties improved by enzymatic deamidation. *J. Cereal Sci.* 64, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.04.010>
- Joseph, T., Morrison, M., 2006. *Nanotechnology in Agriculture and Food: A Nanoforum Report*.

- Nanoforum.org. Institute for Nanotechnology (European Commission). Dostupno na: <https://www.nanowerk.com/nanotechnology/reports/reportpdf/report61.pdf>
- Juárez, J., Taboada, P., Mosquera, V., 2009. Existence of different structural intermediates on the fibrillation pathway of human serum albumin. *Biophys. J.* 96, 2353–2370. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.12.3901>
- Jukanti, A.K., Gaur, P.M., Gowda, C.L.L., Chibbar, R.N., 2012. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review. *Br. J. Nutr.* 108, 11–26. <https://doi.org/10.1017/S0007114512000797>
- Jung, S., Lamsal, B.P., Stepien, V., Johnson, L.A., Murphy, P.A., 2006. Functionality of soy protein produced by enzyme-assisted extraction. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 83, 71–78. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-1178-y>
- Karaca, A.C., Low, N., Nickerson, M., 2011. 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>
- Karimi, A., Azizi, M.H., Ahmadi Gavlighi, H., 2020. Fraktionation of hydrolysate from corn germ protein by ultrafiltration: In vitro antidiabetic and antioxidant activity. *Food Sci. Nutr.* 8, 2395–2405. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1529>
- Kaur, M., Singh, N., 2007. Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chem.* 102, 366–374. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.029>
- Kaur, M., Singh, N., Sodhi, N.S., 2005. Physicochemical, cooking, textural and roasting characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *J. Food Eng.* 69, 511–517. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.09.002>
- Kaur, R., Prasad, K., 2021a. Technological, processing and nutritional aspects of chickpea (*Cicer arietinum*) - A review. *Trends Food Sci. Technol.* 109, 448–463. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.044>
- Kaur, R., Prasad, K., 2021b. Nutritional characteristics and value-added products of Chickpea (*Cicer arietinum*)-a review. *J. Postharvest Technol.* 9, 1–13.
- Keskin, S.O., Ali, T.M., Ahmed, J., Shaikh, M., Siddiq, M., Uebersax, M.A., 2022. Physico-chemical and functional properties of legume protein, starch, and dietary fiber—A review. *Legum. Sci.* 4, 1–15. <https://doi.org/10.1002/leg3.117>
- Kimura, A., Takako, F., Meili, Z., Shiori, M., Maruyama, N., Utsumi, S., 2008. Comparison of physicochemical properties of 7S and 11S globulins from pea, fava bean, cowpea, and French bean with those of soybean-french bean 7S globulin exhibits excellent properties. *J. Agric. Food Chem.* 56, 10273–10279. <https://doi.org/10.1021/jf801721b>
- Kinsella, J.E., 1981. Functional properties of proteins: Possible relationships between structure and function in foams. *Food Chem.* 7, 273–288. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(81\)90033-9](https://doi.org/10.1016/0308-8146(81)90033-9)
- Kinsella, J.E., 1979. Functional Properties of Soy Proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56, 242–258. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02671468>
- Koyoro, H., Powers, J., 1987. Functional properties of pea globulin fractions. *Cereal Chem.* 64, 97–

101.

- Kumar, M., Tomar, M., Potkule, J., Verma, R., Punia, S., Mahapatra, A., Belwal, T., Dahuja, A., Joshi, S., Berwal, M.K., Satankar, V., Bhoite, A.G., Amarowicz, R., Kaur, C., Kennedy, J.F., 2021. Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. *Food Hydrocoll.* 115, 106595. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106595>
- L'Hocine, L., Boye, J.I., Arcand, Y., 2006. Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures. *J. Food Sci.* 71, 137-145. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb15609.x>
- 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>
- Lafarga, T., Álvarez, C., Villaró, S., Bobo, G., Aguiló-Aguayo, I., 2020. Potential of pulse-derived proteins for developing novel vegan edible foams and emulsions. *Int. J. Food Sci. Technol.* 55, 475–481. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14286>
- Lam, A.C.Y., Can Karaca, A., Tyler, R.T., Nickerson, M.T., 2018. Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Food Rev. Int.* 34, 126–147. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1242135>
- 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>
- Lamsal, B.P., Murphy, P.A., Johnson, L.A., 2006. Flaking and extrusion as mechanical treatments for enzyme-assisted aqueous extraction of oil from soybeans. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83, 973–979. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-5055-5>
- Li, R., Wang, Xibo, Liu, J., Cui, Q., Wang, Xiaodan, Chen, S., Jiang, L., 2019. Relationship between Molecular Flexibility and Emulsifying Properties of Soy Protein Isolate-Glucose Conjugates. *J. Agric. Food Chem.* 67, 4089–4097. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06713>
- Li, X., Li, Y., Hua, Y., Qiu, A., Yang, C., Cui, S., 2007. Effect of concentration, ionic strength and freeze-drying on the heat-induced aggregation of soy proteins. *Food Chem.* 104, 1410–1417. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.003>
- Li, Y., Zheng, Y., Zhang, Y., Xu, J., Gao, G., 2018. Antioxidant activity of coconut (*Cocos nucifera* L.) protein fractions. *Molecules* 23, 707. <https://doi.org/10.3390/molecules23030707>
- Lin, S.Y., Chu, H.L., Wei, Y.S., 2002. Pressure-induced transformation of α -helix to β -sheet in the secondary structures of amyloid β (1–40) peptide exacerbated by temperature. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 19, 619–625. <https://doi.org/10.1080/07391102.2002.10506768>
- Lin, S.Y., Li, M.J., Wei, Y.S., 2004. Ethanol or/and captopril-induced precipitation and secondary conformational changes of human serum albumin. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 60, 3107–3111. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.03.001>
- Lindgren, E., Harris, F., Dangour, A.D., Gasparatos, A., Hiramatsu, M., Javadi, F., Loken, B., Murakami, T., Scheelbeek, P., Haines, A., 2018. Sustainable food systems—a health perspective. *Sustain. Sci.* 13, 1505–1517. <https://doi.org/10.1007/s11625-018-0586-x>
- Liu, C. mei, Peng, Q., Zhong, J. zhen, Liu, W., Zhong, Y. jun, Wang, F., 2018. Molecular and

- Functional Properties of Protein Fractions and Isolate from Cashew Nut (*Anacardium occidentale* L.). *Molecules* 23, 393. <https://doi.org/10.3390/molecules23020393>
- Liu, F., Tang, C.H., 2013. Soy protein nanoparticle aggregates as pickering stabilizers for oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 61, 8888–8898. <https://doi.org/10.1021/jf401859y>
- Liu, J.J., Gasmalla, M.A.A., Li, P., Yang, R., 2016. Enzyme-assisted extraction processing from oilseeds: Principle, processing and application. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 35, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.05.002>
- Liu, L.H., Hung, T. V., Bennett, L., 2008. Extraction and characterization of chickpea (*Cicer arietinum*) albumin and globulin. *J. Food Sci.* 73, 299–305. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00773.x>
- Liu, Q., Jiang, L., Li, Y., Wang, S., Wang, M., 2011. Study on aqueous enzymatic extraction of red bean protein. *Procedia Eng.* 15, 5035–5045. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.08.936>
- Liu, Y.F., Oey, I., Bremer, P., Carne, A., Silcock, P., 2017. Effects of pH, temperature and pulsed electric fields on the turbidity and protein aggregation of ovomucin-depleted egg white. *Food Res. Int.* 91, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.005>
- Lomakina, K., Míková, K., 2006. A study of the factors affecting the foaming properties of egg white - A review. *Czech J. Food Sci.* 24, 110–118. <https://doi.org/10.17221/3305-cjfs>
- Long, G., Ji, Y., Pan, H., Sun, Z., Li, Y., Qin, G., 2015. Characterization of thermal denaturation structure and morphology of soy glycinin by FTIR and SEM. *Int. J. Food Prop.* 18, 763–774. <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.908206>
- Ma, C.Y., Harwalkar, V.R., 1984. Chemical characterization and functionality assessment of oat protein fractions. *J. Agric. Food Chem.* 32, 144–149. <https://doi.org/10.1021/jf00121a035>
- Maciel, R.R.G., De Almeida, A.A., Godinho, O.G.C., Gorza, F.D.S., Pedro, G.C., Trescher, T.F., Silva, J.R., De Souza, N.C., 2013. Ascorbic acid and BSA protein in solution and films: Interaction and surface morphological structure. *Biomed Res. Int.* 2013, 461365. <https://doi.org/10.1155/2013/461365>
- Makeri, M.U., Mohamed, S.A., Karim, R., Ramakrishnan, Y., Muhammad, K., 2017. Fractionation, physicochemical, and structural characterization of winged bean seed protein fractions with reference to soybean. *Int. J. Food Prop.* 20, 2220–2236. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1369101>
- Marathe, S.J., Jadhav, S.B., Bankar, S.B., Singhal, R.S., 2017. Enzyme-Assisted Extraction of Bioactives, In Puri, M. (Ed.), *Food Bioactives*. Springer, 171–201.
- Martínez-López, A.L., Pangua, C., Reboredo, C., Campión, R., Morales-Gracia, J., Irache, J.M., 2020. Protein-based nanoparticles for drug delivery purposes. *Int. J. Pharm.* 581, 119289. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119289>
- Matemu, A., Nakamura, S., Katayama, S., 2021. Health benefits of antioxidative peptides derived from legume proteins with a high amino acid score. *Antioxidants* 10, 316. <https://doi.org/10.3390/antiox10020316>
- McCleary, B. V., McKie, V.A., Draga, A., Rooney, E., Mangan, D., Larkin, J., 2015. Hydrolysis of wheat flour arabinoxylan, acid-debranched wheat flour arabinoxylan and arabino-xylo-

- oligosaccharides by β -xylanase, α -l-arabinofuranosidase and β -xylosidase. *Carbohydr. Res.* 407, 79–96. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.01.017>
- McClements, D.J., Xiao, H., 2017. Is nano safe in foods? Establishing the factors impacting the gastrointestinal fate and toxicity of organic and inorganic food-grade nanoparticles. *npj Sci. Food* 1. <https://doi.org/10.1038/s41538-017-0005-1>
- McClements, D.J., Xiao, H., Demokritou, P., 2017. Physicochemical and colloidal aspects of food matrix effects on gastrointestinal fate of ingested inorganic nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 246, 165–180. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.010>
- McIntyre, R.A., 2012. Common nano-materials and their use in real world applications. *Sci. Prog.* 95, 1–22. <https://doi.org/10.3184/003685012X13294715456431>
- Mehryar, L., Esmaili, M., Zeynali, F., Imani, M., Sadeghi, R., 2021. Fabrication and characterization of sunflower protein isolate nanoparticles, and their potential for encapsulation and sustainable release of curcumin. *Food Chem.* 355, 129572. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129572>
- Mession, J.L., Sok, N., Assifaoui, A., Saurel, R., 2013. Thermal denaturation of pea globulins (*Pisum sativum* L.) - Molecular interactions leading to heat-induced protein aggregation. *J. Agric. Food Chem.* 61, 1196–1204. <https://doi.org/10.1021/jf303739n>
- Meuser, F., 2001. Technological aspects of dietary fibre. In McCleary, B.V., Prosky, L. (eds) *Advanced dietary fibre technology*. Oxford: Blackwell Science, 248–269. <https://doi.org/10.1002/9780470999615.ch23>
- Mills, E.N.C., Huang, L., Noel, T.R., Gunning, A.P., Morris, V.J., 2001. Formation of thermally induced aggregates of the soya globulin β -conglycinin. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1547, 339–350. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00199-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00199-6)
- Mine, Y., 1995. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends Food Sci. Technol.* 6, 225–232. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89083-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89083-4)
- Momen, S., Alavi, F., Aider, M., 2021. Alkali-mediated treatments for extraction and functional modification of proteins: Critical and application review. *Trends Food Sci. Technol.* 110, 778–797. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.052>
- Moreno, M.T., Cubero, J.I., 1978. Variation in *Cicer arietinum* L. *Euphytica* 27, 465–485. <https://doi.org/10.1007/BF00043173>
- Morris, E. R., 2001. Assembly and Rheology of Non-Starch Polysaccharides. In McCleary, B.V., Prosky, L. (eds) *Advanced Dietary Fibre Technology*. Oxford: Blackwell Science, 30–41. <https://doi.org/10.1002/9780470999615.ch4>
- 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>
- Mundi, S., Aluko, R.E., 2012. Physicochemical and functional properties of kidney bean albumin and globulin protein fractions. *Food Res. Int.* 48, 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.04.006>
- Murray, D.R., McC. Roxburgh, C., 1984. Amino acid composition of the seed albumins from chickpea. *J. Sci. Food Agric.* 35, 893–896. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740350813>

- Mustafa, R., Reaney, M.J.T., 2020. Aquafaba, from Food Waste to a Value-Added Product. In Campos-Vega, R., Oomah, B. D., Vergara-Castañeda, H. A. (eds) Food Wastes By-products: Nutraceutical and Health Potential. 93–126. <https://doi.org/10.1002/9781119534167.ch4>
- Nadar, S.S., Rao, P., Rathod, V.K., 2018. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Res. Int.* 108, 309–330. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.006>
- Naghshi, S., Sadeghi, O., Willett, W.C., Esmailzadeh, A., 2020. Dietary intake of total, animal, and plant proteins and risk of all cause, cardiovascular, and cancer mortality: Systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ* 370, 2412. <https://doi.org/10.1136/bmj.m2412>
- Naseer, B., Srivastava, G., Qadri, O.S., Faridi, S.A., Islam, R.U., Younis, K., 2018. Importance and health hazards of nanoparticles used in the food industry. *Nanotechnol. Rev.* 7, 623–641. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2018-0076>
- Nelson, D. L., Cox, M. M., 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth Edition, W. H. Freeman, New York. 1119
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., Durrieu, V., 2014. Comparative study of encapsulation of vitamins with native and modified soy protein. *Food Hydrocoll.* 38, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.011>
- Ning, F., Ge, Z., Qiu, L., Wang, X., Luo, L., Xiong, H., Huang, Q., 2020. Double-induced se-enriched peanut protein nanoparticles preparation, characterization and stabilized food-grade pickering emulsions. *Food Hydrocoll.* 99, 105308. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105308>
- Nowick, J.S., 2008. Exploring β -sheet structure and interactions with chemical model systems. *Acc. Chem. Res.* 41, 1319–1330. <https://doi.org/10.1021/ar800064f>
- Nwachukwu, I.D., Aluko, R.E., 2018. Physicochemical and emulsification properties of flaxseed (*Linum usitatissimum*) albumin and globulin fractions. *Food Chem.* 255, 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.068>
- Official Methods of Analysis (1995) 16th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, sec. 33.2.11, Method 991.20.
- Osborne, T.B., 1907. The proteins of the wheat kernel. Carnegie Institution of Washington, D. C. 84. <https://doi.org/10.1126/science.26.677.865>
- Osemwota, E.C., Alashi, A.M., Aluko, R.E., 2021. Comparative study of the structural and functional properties of membrane-isolated and isoelectric ph precipitated green lentil seed protein isolates. *Membranes.* 11, 694. <https://doi.org/10.3390/membranes11090694>
- Özer, S.S., Karaköy, T., Toklu, F., Baloch, F.S., Kilian, B., Özkan, H., 2010. Nutritional and physicochemical variation in Turkish kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) landraces. *Euphytica* 175, 237–249. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0174-3>
- Pan, K., Zhong, Q., 2016. Organic Nanoparticles in Foods: Fabrication, Characterization, and Utilization. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 7, 245–266. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033215>

- Papalamprou, E.M., Doxastakis, G.I., Biliaderis, C.G., Kiosseoglou, V., 2009. Influence of preparation methods on physicochemical and gelation properties of chickpea protein isolates. *Food Hydrocoll.* 23, 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.03.006>
- Paraman, I., Hettiarachchy, N.S., Schaefer, C., 2008. Preparation of rice endosperm protein isolate by alkali extraction. *Cereal Chem.* 85, 76–81. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-85-1-0076>
- Paredes-Lopez, O., Ordorica-Falomir, C., Olivares-Vasques, M.R., 1991. Chickpea Protein Isolates: Physicochemical, Functional and Nutritional Characterization. *J. Food Sci.* 56, 726–729. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb05367.x>
- Pascoli, M., de Lima, R., Fraceto, L.F., 2018. Zein nanoparticles and strategies to improve colloidal stability: A mini-review. *Front. Chem.* 6, 1–5. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00006>
- Patil, S.R., Dayanand, A., 2006. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. *Bioresour. Technol.* 97, 2054–2058. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.09.015>
- Peng, H., Gan, Z., Xiong, H., Luo, M., Yu, N., Wen, T., Wang, R., Li, Y., 2017. Self-Assembly of protein nanoparticles from rice bran waste and their use as delivery system for curcumin. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5, 6605–6614. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00851>
- Peng, W., Kong, X., Chen, Y., Zhang, C., Yang, Y., Hua, Y., 2016. Effects of heat treatment on the emulsifying properties of pea proteins. *Food Hydrocoll.* 52, 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.06.025>
- Perez-Hidalgo, M.A., Guerra-Hernández, E., García-Villanova, B., 1997. Dietary fiber in three raw legumes and processing effect on chick peas by an enzymatic-gravimetric method. *J. Food Compos. Anal.* 10, 66–72. <https://doi.org/10.1006/jfca.1997.0522>
- Perez, A.A., Sponton, O.E., Andermatten, R.B., Rubiolo, A.C., Santiago, L.G., 2015. Biopolymer nanoparticles designed for polyunsaturated fatty acid vehiculization: Protein-polysaccharide ratio study. *Food Chem.* 188, 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.043>
- Perović, M.N., Knežević Jugović, Z.D., Antov, M.G., 2020. Improved recovery of protein from soy grit by enzyme-assisted alkaline extraction. *J. Food Eng.* 276. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109894>
- Phongthai, S., Rawdkuen, S., 2020. Fractionation and characterization of antioxidant peptides from rice bran protein hydrolysates stimulated by in vitro gastrointestinal digestion. *Cereal Chem.* 97, 316–325. <https://doi.org/10.1002/cche.10247>
- Pietroiusti, A., Magrini, A., Campagnolo, L., 2016. New frontiers in nanotoxicology: Gut microbiota/microbiome-mediated effects of engineered nanomaterials. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 299, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.12.017>
- Plietz, B., Damaschum, G., Schwenke, K.D., 1980. Quaternary structure of 11S globulin from different plant seeds. *Stud. Biophys.* 79, 145–146.
- Poria, V., Saini, J.K., Singh, S., Nain, L., Kuhad, R.C., 2020. Arabinofuranosidases: Characteristics, microbial production, and potential in waste valorization and industrial applications. *Bioresour. Technol.* 304, 123019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123019>
- Puri, M., Sharma, D., Barrow, C.J., 2012. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants.

- Trends Biotechnol. 30, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.014>
- Rai, V.R., Bai, J.A., 2017. Nanotechnology Applications in the Food Industry. CRC Press, 556. <https://doi.org/10.1201/9780429488870>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol. Med. 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rincón, F., Martínez, B., Ibáñez, M.V., 1998. Proximate composition and antinutritive substances in chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by the biotype factor. J. Sci. Food Agric. 78, 382–388. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199811\)78:3<382::AID-JSFA128>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199811)78:3<382::AID-JSFA128>3.0.CO;2-J)
- Rommi, K., Hakala, T.K., Holopainen, U., Nordlund, E., Poutanen, K., Lantto, R., 2014. Effect of enzyme-aided cell wall disintegration on protein extractability from intact and dehulled rapeseed (*Brassica rapa* L. and *Brassica napus* L.) press cakes. J. Agric. Food Chem. 62, 7989–7997. <https://doi.org/10.1021/jf501802e>
- Rosset, M., Acquaro, V.R., Beléia, A.D.P., 2012. Protein extraction from defatted soybean flour with Viscozyme L pretreatment. J. Food Process. Preserv. 38, 784–790. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12030>
- Russin, T.A., Boye, J.I., Arcand, Y., Rajamohamed, S.H., 2011. Alternative Techniques for Defatting Soy: A Practical Review. Food Bioprocess Technol. 4, 200–223. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0367-8>
- Sá, A.G.A., Moreno, Y.M.F., Carciofi, B.A.M., 2020. Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. Trends Food Sci. Technol. 97, 170–184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.011>
- Safi, C., Frances, C., Ursu, A.V., Laroche, C., Pouzet, C., Vaca-Garcia, C., Pontalier, P.Y., 2015. Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of *Chlorella vulgaris* proteins and pigments in the aqueous phase. Algal Res. 8, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.002>
- Samal, D., 2017. Use of Nanotechnology in Food Industry: A review. Int. J. Environ. Agric. Biotechnol. 2, 2270–2278. <https://doi.org/10.22161/ijeab/2.4.90>
- Samrot, A. V, Ram Singh, S.P., Deenadhayalan, R., Rajesh, V.V., Padmanaban, S., Radhakrishnan, K., 2022. Nanoparticles, a Double-Edged Sword with Oxidant as Well as Antioxidant Properties—A Review. Oxygen 2, 591–604. <https://doi.org/10.3390/oxygen2040039>
- Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Vioque, J., Bautista, J., Millán, F., 1999. Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): Chemical composition, functional properties and protein characterization. Food Chem. 64, 237–243. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00133-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00133-2)
- Sanz, L.C., Perez, A.G., Rios, J.J., Olias, J.M., 1992. Physico-chemical properties of chickpea lipoxygenases. Phytochemistry 31, 3381–3384. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)83690-Z](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)83690-Z)
- Sari, Y.W., Bruins, M.E., Sanders, J.P.M., 2013. Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. Ind. Crops Prod. 43, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.014>
- Sari, Y.W., Mulder, W.J., Sanders, J.P.M., Bruins, M.E., 2015. Towards plant protein refinery:

- Review on protein extraction using alkali and potential enzymatic assistance. *Biotechnol. J.* 10, 1138–1157. <https://doi.org/10.1002/biot.201400569>
- Sathe, S.K., Salunkhe, D.K., 1981. Functional Properties of the Great Northern Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Proteins: Emulsion, Foaming, Viscosity, and Gelation Properties. *J. Food Sci.* 46, 71–81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb14533.x>
- Schmidt, B., 2006. Proteins: Structure and Function. By David Whitford. *ChemBioChem* 7, 702–703. <https://doi.org/10.1002/cbic.200600064>
- Sekhon, B.S., 2010. Food nanotechnology - an overview. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 3, 1–15.
- Sengupta, A., Sarkar, A., 2022. Synthesis and characterization of nanoparticles from neem leaves and banana peels: a green prospect for dye degradation in wastewater. *Ecotoxicology* 31, 537–548. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02414-5>
- Shahidi, F., Zhong, Y., 2010. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112, 930–940. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000044>
- Shahraki, S., Heydari, A., Saeidifar, M., Gomroki, M., 2018. Biophysical and computational comparison on the binding affinity of three important nutrients to β -lactoglobulin: folic acid, ascorbic acid and vitamin K3. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 36, 3651–3665. <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1394222>
- Shao, Y., Tang, C., 2016. Gel-like pea protein Pickering emulsions at pH 3.0 as a potential intestine-targeted and sustained-release delivery system for β -carotene. *Food Res. Int.* 79, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.11.025>
- Shen, X., Fang, T., Gao, F., Guo, M., 2017. Effects of ultrasound treatment on physicochemical and emulsifying properties of whey proteins pre- and post-thermal aggregation. *Food Hydrocoll.* 63, 668–676. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.003>
- Shevkani, K., Singh, N., 2014. Influence of kidney bean, field pea and amaranth protein isolates on the characteristics of starch-based gluten-free muffins. *Int. J. Food Sci. Technol.* 49, 2237–2244. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12537>
- Shevkani, K., Singh, N., Chen, Y., Kaur, A., Yu, L., 2019. Pulse proteins: secondary structure, functionality and applications. *J. Food Sci. Technol.* 56, 2787–2798. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03723-8>
- Shewry, P.R., Napier, J.A., Tatham, A.S., 1995. Seed storage proteins: Structures and biosynthesis. *Plant Cell* 7, 945–956. <https://doi.org/10.2307/3870049>
- Shotwell, M.A. 1999. Oat Globulins. In Shewry, P.R., Casey, R. (eds) *Seed Proteins*. Springer, 389–400. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4431-5_16
- Sim, S.Y.J., Sriv, A., Chiang, J.H., Henry, C.J., 2021. Plant proteins for future foods: A roadmap. *Foods* 10, 1–31. <https://doi.org/10.3390/foods10081967>
- Singh, D.K., Rao, A.S., Singh, R., Jambunathan, R., 1988. Amino acid composition of storage proteins of a promising chickpea (*Cicer arietinum* L) cultivar. *J. Sci. Food Agric.* 43, 373–379. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740430410>
- Singh, G.D., Wani, A.A., Kaur, D., Sogi, D.S., 2008. Characterisation and functional properties of

- proteins of some Indian chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 88, 778–786. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3144>
- Singh, U., Jambunathan, R., 1982. Distribution of seed protein fractions and amino acids in different anatomical parts of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr.* 31, 347–354. <https://doi.org/10.1007/BF01094046>
- Singhal, A., Karaca, A.C., Tyler, R., Nickerson, M., 2016. Pulse Proteins: From Processing to Structure-Function Relationships. In A. K. Goyal (ed.), *Grain Legumes*, IntechOpen, London. 10.5772/64020
- Smartt, J., Nwokolo, E., 2012. *Food and feed from legumes and oilseeds*, Field Crops Research. Springer Science & Business Media.
- Smith, L.J., Fiebig, K.M., Schwalbe, H., Dobson, C.M., 1996. The concept of a random coil : Residual structure in peptides and denatured proteins. *Fold. Des.* 1, 95–106. [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(96\)00046-6](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(96)00046-6)
- Soleimanifar, M., Jafari, S.M., Assadpour, E., 2020. Encapsulation of olive leaf phenolics within electrosprayed whey protein nanoparticles; production and characterization. *Food Hydrocoll.* 101, 105572. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105572>
- Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S., 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30, 1190–1206.
- Sponton, O.E., Perez, A.A., Carrara, C.R., Santiago, L.G., 2016. Complexes between ovalbumin nanoparticles and linoleic acid: Stoichiometric, kinetic and thermodynamic aspects. *Food Chem.* 211, 819–826. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.137>
- Sponton, O.E., Perez, A.A., Carrara, C.R., Santiago, L.G., 2015a. Impact of environment conditions on physicochemical characteristics of ovalbumin heat-induced nanoparticles and on their ability to bind PUFAs. *Food Hydrocoll.* 48, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.011>
- Sponton, O.E., Perez, A.A., Carrara, C.R., Santiago, L.G., 2015b. Linoleic acid binding properties of ovalbumin nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 128, 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.01.037>
- Sponton, O.E., Perez, A.A., Ramel, J. V., Santiago, L.G., 2017. Protein nanovehicles produced from egg white. Part 1: Effect of pH and heat treatment time on particle size and binding capacity. *Food Hydrocoll.* 73, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.033>
- Sponton, O.E., Perez, A.A., Stechina, M.F., Santiago, L.G., 2020. Production of protein nanovehicles by heat treatment of industrial egg white in a batch reactor. *J. Food Eng.* 268, 109740. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109740>
- Sripriyalakshmi, S., Jose, P., Ravindran, A., Anjali, C.H., 2014. Recent Trends in Drug Delivery System Using Protein Nanoparticles. *Cell Biochem. Biophys.* 70, 17–26. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-9896-5>
- Stoldt, W., 1949. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau: Zeitschrift für Lebensmittelkunde und Lebensmittelrecht.* Dtsch. Leb. Rundsch. 45, 41–46.
- Suliman, M.A., El Tinay, A.H., Elkhailifa, A.E.O., Babiker, E.E., Elkhailil, E.A.I., 2006. Solubility as influenced by pH and NaCl concentration and functional properties of lentil proteins isolate.

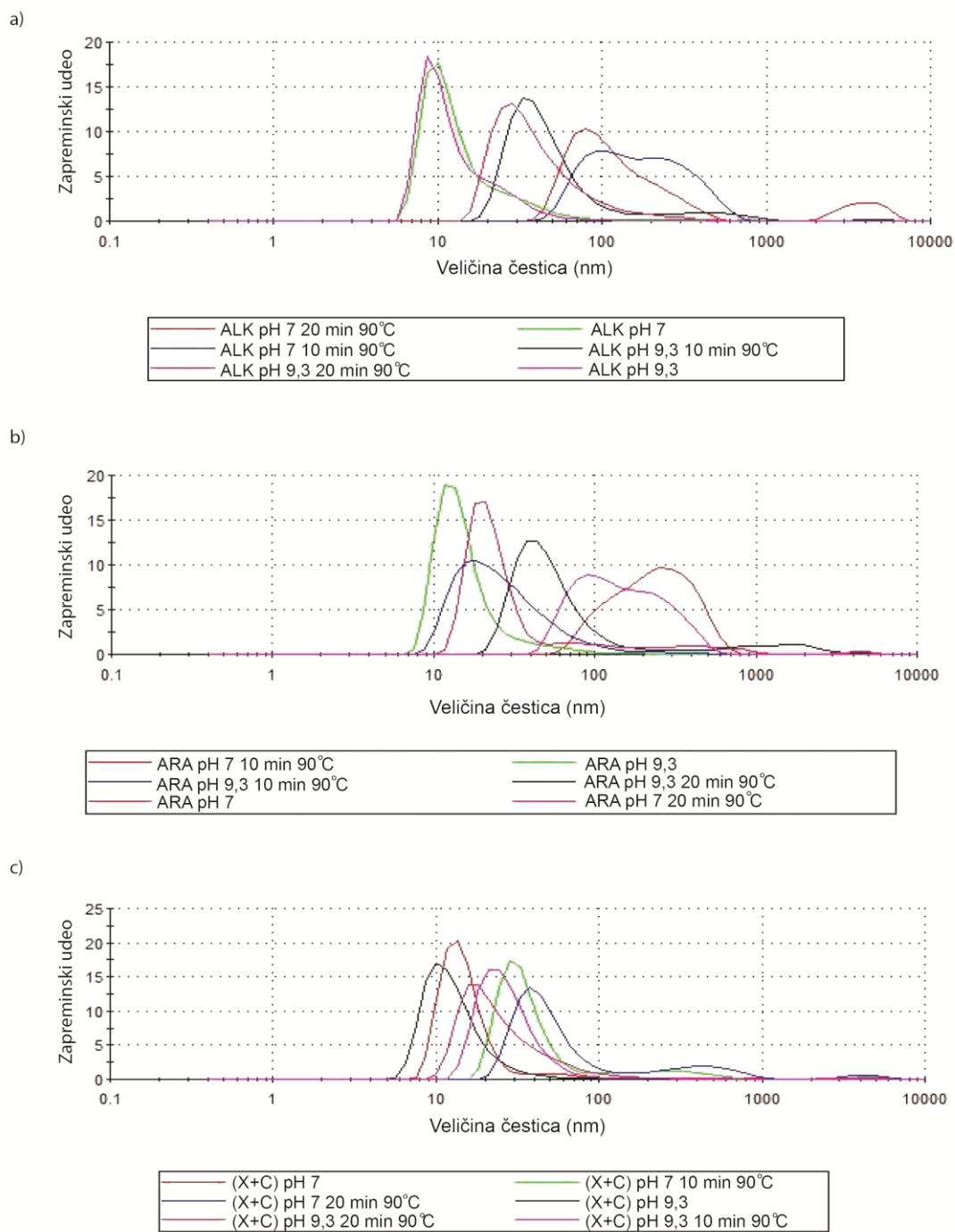
- Pakistan J. Nutr. 5, 589–593. <https://doi.org/10.3923/pjn.2006.589.593>
- Taghi, M., Gharibzahedi, S., Smith, B., 2020. The functional modification of legume proteins by ultrasonication: A review. Trends Food Sci. Technol. 98, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.002>
- Takaiwa, F., Ogawa, M., Okita, W.T., 1999. Rice glutelins, In Shewry, P.R., Casey, R. (eds) Seed Proteins. Springer, 401–425. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4431-5_17
- Tan, E.S., Ying-Yuan, N., Gan, C.Y., 2014. A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimisation. Food Chem. 152, 447–455. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.008>
- Tang, H., Fu, T., Feng, Y., Zhang, S., Wang, C., Zhang, D., 2019. Effect of heat treatment on solubility, surface hydrophobicity and structure of rice bran albumin and globulin. Qual. Assur. Saf. Crop. Foods. 11, 499–509. <https://doi.org/10.3920/QAS2018.1402>
- Tang, N., Zhuang, H., 2014. Evaluation of antioxidant activities of zein protein fractions. J. Food Sci. 79, 2174–2184. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12686>
- Tarhini, M., Greige-Gerges, H., Elaissari, A., 2017. Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules. Int. J. Pharm. 522, 172–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.067>
- Tavano, O.L., Da Silva, S.I., Démonde, A., Neves, V.A., 2008. Nutritional responses of rats to diets based on chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed meal or its protein fractions. J. Agric. Food Chem. 56, 11006–11010. <https://doi.org/10.1021/jf8010799>
- Teng, Z., Luo, Y., Wang, Q., 2012. Nanoparticles synthesized from soy protein: Preparation, characterization, and application for nutraceutical encapsulation. J. Agric. Food Chem. 60, 2712–2720. <https://doi.org/10.1021/jf205238x>
- Thakur, A., Sharma, K., Goyal, A., 2019. α -L-Arabinofuranosidase: A Potential Enzyme for the Food Industry. In Parameswaran, B., Varjani, S., Raveendran, S. (eds) Green Bio-processes. Energy, Environment, and Sustainability. Springer, 229–244. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_12
- Tirgar, M., Silcock, P., Carne, A., Birch, E.J., 2017. Effect of extraction method on functional properties of flaxseed protein concentrates. Food Chem. 215, 417–424. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.002>
- Tiwari, P., Chintagunta, A.D., Dirisala, V.R., Sampath Kumar, N.S. 2020. Legume Derived Bioactive Peptides. In Guleria, P., Kumar, V., Lichtfouse, E. (eds) Sustainable Agriculture Reviews 45. Springer, 29-52. https://doi.org/10.1007/978-3-030-53017-4_2
- Tomičić, Z., Spasevski, N., Popović, S., Banjac, V., Đuragić, O., Tomičić, R., 2020. By-products of the oil industry as sources of amino acids in feed. Food Feed Res. 47, 131–137. <https://doi.org/10.5937/ffr47-28435>
- Tosh, S.M., Yada, S., 2010. Dietary fibres in pulse seeds and fractions: Characterization, functional attributes, and applications. Food Res. Int. 43, 450–460. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.005>

- Townsend, A. -A, Nakai, S., 1983. Relationships Between Hydrophobicity and Foaming Characteristics of Food Proteins. *J. Food Sci.* 48, 588–594. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb10796.x>
- Tuamnee, C., 2022. Assortment of beans and lentils in wooden spoon with wood box macadamia isolated on white . mung bean, groundnut, soybean, red kidney bean , black bean, red bean and brown pinto beans (digitalna slika ID: 372247999). Dostupna na: <https://www.shutterstock.com>. Pristupljeno dana: 06 Decembar, 2022.
- Vergara-Barberán, M., Lerma-García, M.J., Herrero-Martínez, J.M., Simó-Alfonso, E.F., 2015. Use of an enzyme-assisted method to improve protein extraction from olive leaves. *Food Chem.* 169, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.116>
- Verma, D., Gulati, N., Kaul, S., Mukherjee, S., Nagaich, U., 2018. Protein Based Nanostructures for Drug Delivery. *J. Pharm.* 2018, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2018/9285854>
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., Millán, F., 1999. Purification and partial characterization of chickpea 2S albumin. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1405–1409. <https://doi.org/10.1021/jf980819k>
- Voci, S., Gagliardi, A., Fresta, M., Cosco, D., 2022. Ascorbic acid-loaded gliadin nanoparticles as a novel nutraceutical formulation. *Food Res. Int.* 161, 111869. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111869>
- Wan, Z.L., Guo, J., Yang, X.Q., 2015. Plant protein-based delivery systems for bioactive ingredients in foods. *Food Funct.* 6, 2876–2889. <https://doi.org/10.1039/c5fo00050e>
- Wang, C., Jiang, L., Wei, D., Li, Y., Sui, X., Wang, Z., Li, D., 2011. Effect of secondary structure determined by FTIR spectra on surface hydrophobicity of soybean protein isolate. *Procedia Eng.* 15, 4819–4827. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.08.900>
- Wang, H., Johnson, L.A., Wang, T., 2004. Preparation of soy protein concentrate and isolate from extruded-expelled soybean meals. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81, 713–717. <https://doi.org/10.1007/s11746-004-966-8>
- Wang, M., Hettiarachchy, N.S., Qi, M., Burks, W., Siebenmorgen, T., 1999. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* 47, 411–416. <https://doi.org/10.1021/jf9806964>
- Wang, M.P., Chen, X.W., Guo, J., Yang, J., Wang, J.M., Yang, X.Q., 2019. Stabilization of foam and emulsion by subcritical water-treated soy protein: Effect of aggregation state. *Food Hydrocoll.* 87, 619–628. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.047>
- Wang, R., Tian, Z., Chen, L., 2011. Nano-encapsulations liberated from barley protein microparticles for oral delivery of bioactive compounds. *Int. J. Pharm.* 406, 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.039>
- Wang, W., Nema, S., Teagarden, D., 2010a. Protein aggregation-Pathways and influencing factors. *Int. J. Pharm.* 390, 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.02.025>
- Wang, Z., Li, H., Liang, M., Yang, L., 2016. Glutelin and prolamin, different components of rice protein, exert differently in vitro antioxidant activities. *J. Cereal Sci.* 72, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.10.006>

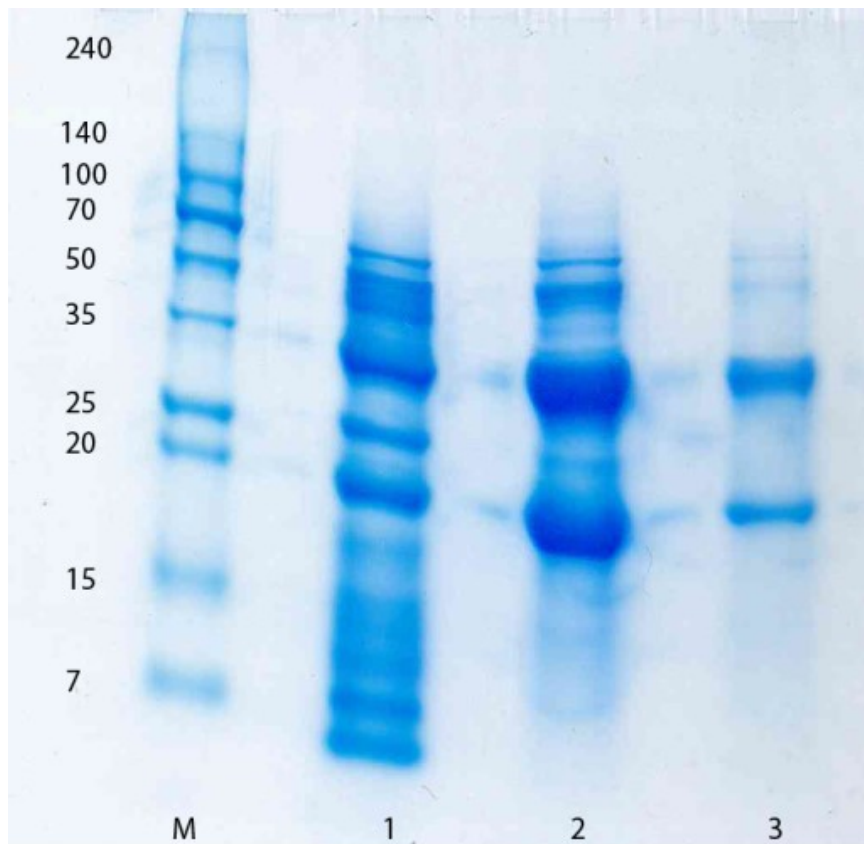
- Wang, Z., Li, Y., Jiang, L., Qi, B., Zhou, L., 2014. Relationship between secondary structure and surface hydrophobicity of soybean protein isolate subjected to heat treatment. *J. Chem.* 2014, 475389. <https://doi.org/10.1155/2014/475389>
- Weiss, J., Takhistov, P., McClements, D.J., 2006. Functional materials in food nanotechnology. *J. Food Sci.* 71, 107–116. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00195.x>
- Willett, W., Rockström, J., Loken, B., Springmann, M., Lang, T., Vermeulen, S., Garnett, T., Tilman, D., DeClerck, F., Wood, A., Jonell, M., Clark, M., Gordon, L.J., Fanzo, J., Hawkes, C., Zurayk, R., Rivera, J.A., De Vries, W., Majele Sibanda, L., Afshin, A., Chaudhary, A., Herrero, M., Agustina, R., Branca, F., Lartey, A., Fan, S., Crona, B., Fox, E., Bignet, V., Troell, M., Lindahl, T., Singh, S., Cornell, S.E., Srinath Reddy, K., Narain, S., Nishtar, S., Murray, C.J.L., 2019. Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *Lancet* 393, 447–492. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31788-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31788-4)
- Withana-Gamage, T.S., Wanasundara, J.P., Pietrasik, Z., Shand, P.J., 2011. Physicochemical, thermal and functional characterisation of protein isolates from Kabuli and Desi chickpea (*Cicer arietinum* L.): A comparative study with soy (*Glycine max*) and pea (*Pisum sativum* L.). *J. Sci. Food Agric.* 91, 1022–1031. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4277>
- Wood, J.A., Tan, H.T., Collins, H.M., Yap, K., Khor, S.F., Lim, W.L., Xing, X., Bulone, V., Burton, R.A., Fincher, G.B., Tucker, M.R., 2018a. Genetic and environmental factors contribute to variation in cell wall composition in mature desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) cotyledons. *Plant Cell Environ.* 41, 2195–2208. <https://doi.org/10.1111/pce.13196>
- Wood, J.A., Tan, H.T., Collins, H.M., Yap, K., Khor, S.F., Lim, W.L., Xing, X., Bulone, V., Burton, R.A., Fincher, G.B., Tucker, M.R., 2018b. Genetic and environmental factors contribute to variation in cell wall composition in mature desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) cotyledons. *Plant Cell Environ.* 41, 2195–2208. <https://doi.org/10.1111/pce.13196>
- 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, W.U., Hettiarachchy, N.S., Qi, M., 1998. Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of soy protein peptides prepared by papain modification and ultrafiltration. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 845–850. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0235-0>
- Xu, X., Liu, W., Liu, C., Luo, L., Chen, J., Luo, S., McClements, D.J., Wu, L., 2016. Effect of limited enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of rice glutelin. *Food Hydrocoll.* 61, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.023>
- Yang, J., Zhou, Y., Chen, L., 2014. Elaboration and characterization of barley protein nanoparticles as an oral delivery system for lipophilic bioactive compounds. *Food Funct.* 5, 92–101. <https://doi.org/10.1039/c3fo60351b>
- Ye, M.P., Zhou, R., Shi, Y.R., Chen, H.C., Du, Y., 2017. Effects of heating on the secondary structure of proteins in milk powders using mid-infrared spectroscopy. *J. Dairy Sci.* 100, 89–95. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11443>
- Yuan, H.N., Lv, J.M., Gong, J.Y., Xiao, G.N., Zhu, R.Y., Li, L., Qiu, J.N., 2018. Secondary structures and their effects on antioxidant capacity of antioxidant peptides in yogurt. *Int. J. Food*

- Prop. 21, 2176–2180. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1501700>
- Zahra, M., Faizan, A., Salam, I., Sadaf, Z., 2022. Application of nanotechnology in different aspects of the food industry. *Discov. Food*, 2. <https://doi.org/10.1007/s44187-022-00013-9>
- Zayas, J., 1997. *Functionality of Proteins in Food*. Springer, 373. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-59116-7>
- Zhang, Y.H., Tang, C.H., Wen, Q.B., Yang, X.Q., Li, L., Deng, W.L., 2010. Thermal aggregation and gelation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate at pH 2.0: Influence of ionic strength. *Food Hydrocoll.* 24, 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.002>
- Zhang, Z., Regenstein, J.M., Zhou, P., Yang, Y., 2017. Effects of high intensity ultrasound modification on physicochemical property and water in myofibrillar protein gel. *Ultrason. Sonochem.* 34, 960–967. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.08.008>
- Zhong, W., Wang, Y., Yu, J., Liang, Y., Ni, K., Tu, S., 2004. The Interaction of Human Serum Albumin with a Novel Antidiabetic Agent - SU-118. *J. Pharm. Sci.* 93, 1039-1046. <https://doi.org/10.1002/jps.20005>
- Zhong, L., Fang, Z., Wahlqvist, M.L., Wu, G., Hodgson, J.M., Johnson, S.K., 2018. Seed coats of pulses as a food ingredient: Characterization, processing, and applications. *Trends Food Sci. Technol.* 80, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.021>
- Zhou, C., Hu, J., Yu, X., Yagoub, A.E.G.A., Zhang, Y., Ma, H., Gao, X., Otu, P.N.Y., 2017. Heat and/or ultrasound pretreatments motivated enzymolysis of corn gluten meal: Hydrolysis kinetics and protein structure. *LWT.* 77, 488–496. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.048>
- Zhu, K.X., Sun, X.H., Chen, Z.C., Peng, W., Qian, H.F., Zhou, H.M., 2010. Comparison of functional properties and secondary structures of defatted wheat germ proteins separated by reverse micelles and alkaline extraction and isoelectric precipitation. *Food Chem.* 123, 1163–1169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.081>
- Žilić, S., Akillioğlu, G., Serpen, A., Barać, M., Gökmen, V., 2012. Effects of isolation, enzymatic hydrolysis, heating, hydration and Maillard reaction on the antioxidant capacity of cereal and legume proteins. *Food Res. Int.* 49, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.031>
- Zou, T. Bin, He, T.P., Li, H. Bin, Tang, H.W., Xia, E.Q., 2016. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules* 21, 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules21010072>

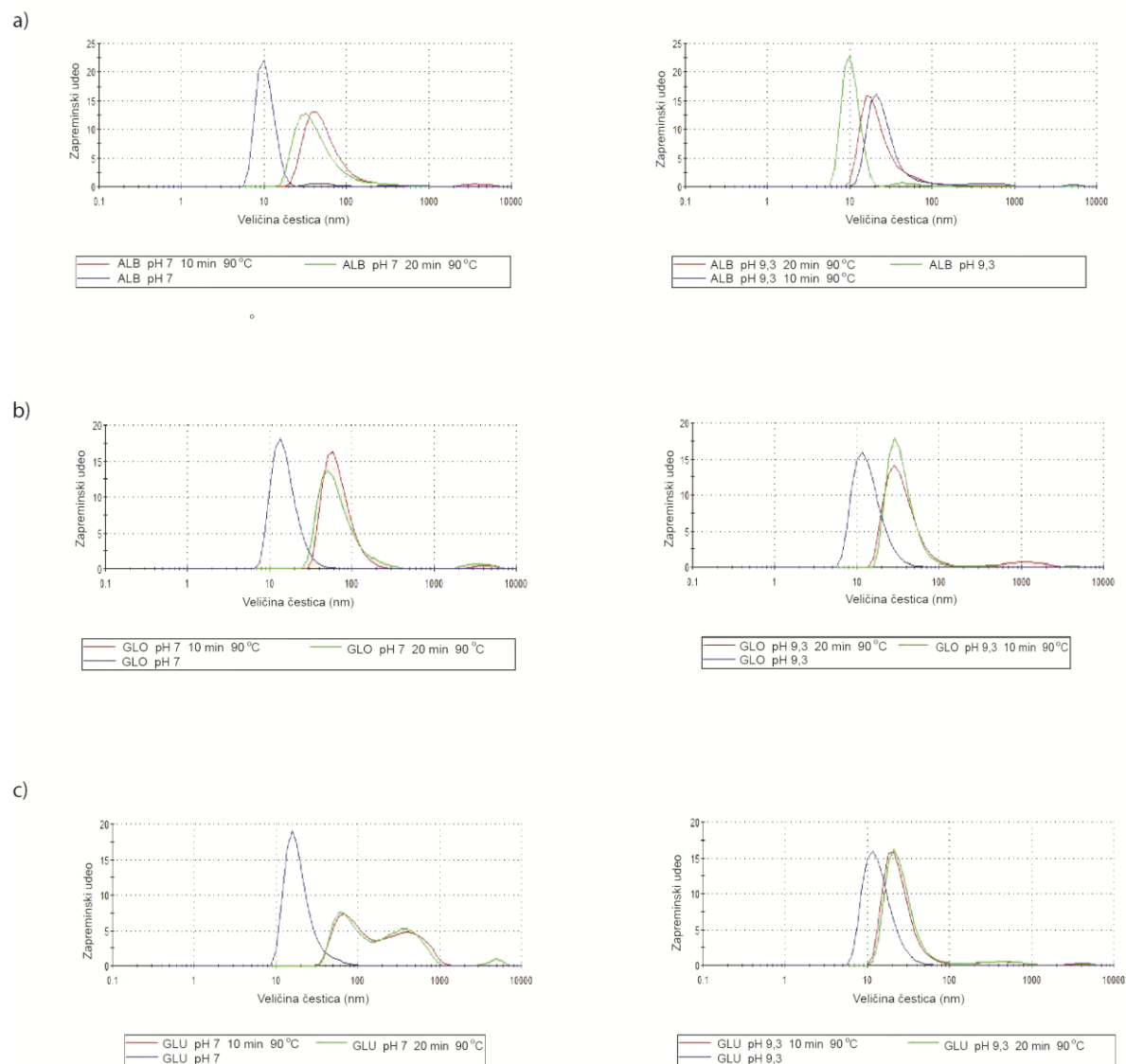
7. Prilozi



Slika S1. Raspodela veličina čestica (PSD) proteinskih nanostrukture pripremljenih iz a) ALK-, b) ARA- i c) (X+C)-izolata; termički tretman: 90 °C tokom 10 i 20 min na pH 7 i 9,3.



Slika S2. Proteinski profili standarda (staza M) i albuminske (staza 1), globulinske (staza 2) i glutelinske (staza 3) frakcije proteina leblebije (u 1 mol/l amonijum-sulfatu) dobijeni SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom



Slika S3. Raspodela veličina čestica (PSD) proteinskih nanostruktura pripremljenih iz a) ALB, b) GLO i c) GLU frakcija proteina leblebije; termički tretman: 90 °C tokom 10 i 20 min na pH 7 i 9,3.

Ovaj Obrazac čini sastavni deo doktorske disertacije, odnosno dokorskog umetničkog projekta koji se brani na Univerzitetu u Novom Sadu. Popunjen Obrazac ukoričiti iza teksta doktorske disertacije, odnosno dokorskog umetničkog projekta.

Plan tretmana podataka

Naziv projekta/istraživanja
Proteini leblebije (<i>Cicer arietinum</i> L.) – enzimaska ekstrakcija, karakterizacija i modifikacija u nanostrukture pogodne za unapređenu primenu
Naziv institucije/institucija u okviru kojih se sprovodi istraživanje
Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad
Naziv programa u okviru kog se realizuje istraživanje
Istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom finansirana su od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, u okviru nacionalnog programa 451-03-68/2022-14/200134
1. Opis podataka

1.1 Vrsta studije

Ukratko opisati tip studije u okviru koje se podaci prikupljaju
Doktorska disertacija

1.2 Vrste podataka

- a) kvantitativni
- ☐ b) kvalitativni

1.3. Način prikupljanja podataka

- a) ankete, upitnici, testovi
- b) kliničke procene, medicinski zapisi, elektronski zdravstveni zapisi
- v) genotipovi: navesti vrstu _____
- g) administrativni podaci: navesti vrstu _____
- d) uzorci tkiva: navesti vrstu _____
- đ) snimci, fotografije: navesti vrstu fotografije ispitivanih uzoraka
- e) tekst, navesti vrstu naučna literatura
- ž) mapa, navesti vrstu _____
- z) ostalo: opisati primena instrumentalnih analiza

1.3 Format podataka, upotrebljene skale, količina podataka

1.3.1 Upotrebljeni softver i format datoteke:

- a) Excel fajl, datoteka .xls _____
 - b) SPSS fajl, datoteka _____
 - c) PDF fajl, datoteka _____
 - d) Tekst fajl, datoteka .doc _____
 - e) JPG fajl, datoteka .jpeg .tiff _____
 - f) Ostalo, datoteka statistički softver Statistica 10.0
-

1.3.2. Broj zapisa (kod kvantitativnih podataka)

- a) broj varijabli veliki broj
b) broj merenja (ispitanika, procena, snimaka i sl.) veliki broj

1.3.3. Ponovljena merenja

- a) da
b) ne

Ukoliko je odgovor da, odgovoriti na sledeća pitanja:

- a) vremenski razmak između ponovljenih merenja je između nekoliko minuta i nekoliko dana
b) varijable koje se više puta mere odnose se na sve eksperimentalne analize
v) nove verzije fajlova koji sadrže ponovljena merenja su imenovane kao _____

Napomene: _____

Da li formati i softver omogućavaju deljenje i dugoročnu validnost podataka?

- a) *Da*
b) *Ne*

Ako je odgovor ne, obrazložiti _____

2. Prikupljanje podataka

2.1 Metodologija za prikupljanje/generisanje podataka

2.1.1. U okviru kog istraživačkog nacrta su podaci prikupljeni?

- a) eksperiment, navesti tip hemijska analiza
b) korelaciono istraživanje, navesti tip _____
c) analiza teksta, navesti tip tumačenje dobijenih rezultata, izvođenje zaključaka i poređenje sa literaturnim podacima
d) ostalo, navesti šta _____

2.1.2 Navesti vrste mernih instrumenata ili standarde podataka specifičnih za određenu naučnu disciplinu (ako postoje).

- Liofilizator *Martin Crist Alpha LSC 2-4*
- HPLC sistem *Agilent 1290 Infinity I*
- Spektrofotometar *Bruker ALPHA*
- Aminoanalizator *Biochrom 30+*
- *omniPAGE Vertical Electrophoresis System*
- Homogenizator *Ultra-Turrax T-25*
- *Zetasizer Nano ZS90*
- Obrada podataka statistički softver *Statistica 10.0.*

2.2 Kvalitet podataka i standardi

2.2.1. Tretman nedostajućih podataka

- a) Da li matrica sadrži nedostajuće podatke? Da **Ne**

Ako je odgovor da, odgovoriti na sledeća pitanja:

-
- a) Koliki je broj nedostajućih podataka? _____
b) Da li se korisniku matrice preporučuje zamena nedostajućih podataka? Da Ne
v) Ako je odgovor da, navesti sugestije za tretman zamene nedostajućih podataka
-

2.2.2. Na koji način je kontrolisan kvalitet podataka? Opisati

Kvalitet podataka je kontrolisan izvođenjem višestrukih merenja i primenom statističkih alata za evaluaciju njihovog kvaliteta.

2.2.3. Na koji način je izvršena kontrola unosa podataka u matricu?

Kontrola unosa podataka je izvršena upoređivanjem dobijenih podataka sa literaturnim podacima.

3. Tretman podataka i prateća dokumentacija

3.1. Tretman i čuvanje podataka

3.1.1. Podaci će biti deponovani u Nacionalnom repozitorijumu disertacija u Srbiji i u repozitorijumu Informacionog sistema naučne delatnosti Univerziteta u Novom Sadu

3.1.2. URL adresa <https://nardus.mpn.gov.rs>,
<http://www.uns.ac.rs/index.php/univerzitet/javnostrada-2/javni-uvod-doktorske>

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Da li će podaci biti u otvorenom pristupu?

- a) Da
b) Da, ali posle embarga koji će trajati do _____
v) Ne

Ako je odgovor ne, navesti razlog _____

3.1.5. *Podaci neće biti deponovani u repozitorijum, ali će biti čuvani.*

Obrazloženje

3.2 Metapodaci i dokumentacija podataka

3.2.1. Koji standard za metapodatke će biti primenjen? _____

3.2.1. Navesti metapodatke na osnovu kojih su podaci deponovani u repozitorijum.

Ako je potrebno, navesti metode koje se koriste za preuzimanje podataka, analitičke i proceduralne informacije, njihovo kodiranje, detaljne opise varijabli, zapisa itd.

3.3 Strategija i standardi za čuvanje podataka

3.3.1. Do kog perioda će podaci biti čuvani u repozitorijumu? _____

3.3.2. Da li će podaci biti deponovani pod šifrom? Da Ne

3.3.3. Da li će šifra biti dostupna određenom krugu istraživača? Da Ne

3.3.4. Da li se podaci moraju ukloniti iz otvorenog pristupa posle izvesnog vremena?

Da Ne

Objasni

4. Bezbednost podataka i zaštita poverljivih informacija

Ovaj odeljak MORA biti popunjen ako vaši podaci uključuju lične podatke koji se odnose na učesnike u istraživanju. Za druga istraživanja treba takođe razmotriti zaštitu i sigurnost podataka.

4.1 Formalni standardi za sigurnost informacija/podataka

Istraživači koji sprovode ispitivanja s ljudima moraju da se pridržavaju Zakona o zaštiti podataka o ličnosti

(https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html)

i odgovarajućeg institucionalnog kodeksa o akademskom integritetu.

4.1.2. Da li je istraživanje odobreno od strane etičke komisije? Da Ne

Ako je odgovor Da, navesti datum i naziv etičke komisije koja je odobrila istraživanje

4.1.2. Da li podaci uključuju lične podatke učesnika u istraživanju? Da Ne

Ako je odgovor da, navedite na koji način ste osigurali poverljivost i sigurnost informacija vezanih za ispitanike:

- a) Podaci nisu u otvorenom pristupu
 - b) Podaci su anonimizirani
 - c) Ostalo, navesti šta
-

5. Dostupnost podataka

5.1. Podaci će biti

a) javno dostupni

b) dostupni samo uskom krugu istraživača u određenoj naučnoj oblasti

c) zatvoreni

Ako su podaci dostupni samo uskom krugu istraživača, navesti pod kojim uslovima mogu da ih koriste:

Ako su podaci dostupni samo uskom krugu istraživača, navesti na koji način mogu pristupiti podacima: _____

5.4. Navesti licencu pod kojom će prikupljeni podaci biti arhivirani.

Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

6. Uloge i odgovornost

6.1. Navesti ime i prezime i mejl adresu vlasnika (autora) podataka

Milica Perović, perovicmilica@uns.ac.rs

6.2. Navesti ime i prezime i mejl adresu osobe koja održava matricu s podacima

Milica Perović, perovicmilica@uns.ac.rs

6.3. Navesti ime i prezime i mejl adresu osobe koja omogućuje pristup podacima drugim istraživačima

Milica Perović, perovicmilica@uns.ac.rs
