



**UNIVERZITET U NOVOM SADU**  
**TEHNOLOŠKI FAKULTET**

*Popović Ljiljana, dipl.inž.*

***Izučavanje funkcionalnih svojstava  
enzimski modifikovanih biljnih  
globulina***

**-Doktorska disertacija-**

**Mentor:**

*Prof. dr Draginja Peričin*

**Novi Sad, 2012.**

# UNIVERZITET U NOVOM SADU

## TEHNOLOŠKI FAKULTET

### Ključna dokumentacijska informacija

**Redni broj:**

**RBR**

**Identifikacioni broj:**

**IBR**

**Tip dokumentacije:** Monografska dokumentacija

**TD**

**Tip zapisa:** Tekstualni štampani materijal

**TZ**

**Vrsta rada** Doktorska disertacija

**(dipl., mag., dokt.):**

**VR**

**Ime i prezime autora:** Ljiljana Popović, dipl. inž.

**AU**

**Mentor (titula, ime,** dr Draginja Peričin, red. prof., Tehnološki fakultet, Novi

**prezime, zvanje):** Sad, Univerzitet u Novom Sadu

**MN**

**Naslov rada:** Izučavanje funkcionalnih svojstava enzimski

**NR** modifikovanih biljnih globulina

**Jezik publikacije:** Srpski (latinica)

**JP**

**Jezik izvoda:** Srpski/Engleski

**JI**

**Zemlja publikovanja:** Srbija

**ZP**

**Uže geografsko područje:** AP Vojvodina

**UGP**

**Godina:** 2012

**GO**

**Izdavač:** Autorski reprint

**IZ**

**Mesto i adresa:** Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

**MA**

**Fizički opis rada:** Broj poglavlja 6, broj stranica 137, broj slika 33, broj tabela

**FO** 19, broj literaturnih navoda 328.

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo, Primenjene inženjerske hemije

**NO**

**Naučna disciplina:** Biohemija, Biohemija hrane, Enzimsko inženjerstvo

**ND**

**Predmetna odrednica,** Biljni globulini, funkcionalne osobine proteina, enzimska

**ključne reči:** hidroliza proteina, enzimsko umrežavanje proteina

**PO**

**UDK****Čuva se:** Biblioteka, Tehnološki fakultet, Novi Sad**ČU** Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad**Važna napomena:** Nema**VN****Izvod:**

Predmet doktorske disertacije je izučavanje različitih bioprocesa za modifikovanje biljnih globulina radi unapređenja njihovih funkcionalnih karakteristika. Istraživanja su zasnovana na karakterizaciji i enzimskoj modifikaciji glavnog rezervnog proteina (12S), kukurbitina, iz semena uljane tikve (*Cucurbita pepo*). Osnova istraživanja je enzimska konverzija globulina i dobijanje proteinskih modifikata delovanjem hidrolaza i transferaza. U okviru istraživanja, enzimski procesi modifikacije globulina izučavani su sa dva aspekta: enzimska hidroliza i enzimsko umrežavanje (cross-linking), primenom komercijalnih enzimskih preparata. Takođe istraživanja obuhvataju i razvoj i kontrolu samih bioprocesa definisanjem i optimizacijom procesnih parametara (temperature, pH, koncentracije enzima i supstrata, vreme reakcije). Ovako definisani procesi eksploatisani su u cilju kreiranja željenih funkcionalnih karakteristika proteina spram njihove potencijalne primene u formulacijama hrane. Odabir i optimizacija procesnih parametara i modelovanje bioprocesa izvedeno je implementiranjem nove kompjuterske i analitičke metodologije.

**Datum prihvatanja****teme od NN-veća:** 11.02.2011.**DP**

**Datum odbrane:**

**DO**

<b>Članovi komisije:</b>	dr Verica Sovilj, redovni profesor,
<b>(Ime i prezime, titula,</b>	Tehnološki fakultet, Novi Sad, predsednik
<b>Zvanje, naziv organizacije,</b>	dr, Svetlana Trivić, redovni profesor,
<b>status)</b>	Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, član
<b>KO</b>	dr Draginja Peričin, redovni profesor,
	Tehnološki fakultet, Novi Sad, član

**UNIVERSITY OF NOVI SAD**  
**FACULTY OF TECHNOLOGY**

**Keyword documentation**

**Accession number:**

**ANO**

**Identification number:**

**INO**

**Document type:** Monograph documentation

**DT**

**Type of record:** Textual printed material

**TR**

**Contents code:** PhD Thesis

**CC**

**Author:** Popović Ljiljana, MSc

**AU**

**Mentor:** Dr Draginja Peričin, Professor, Faculty of Technology

**MN** Novi Sad, University of Novi Sad

**Title:** Investigation of the functional properties of enzymatic modified

**TI** plant globulins

**Language of text:** Serbian (latinic)

**LT**

**Language of abstract:** Serbian/English

**LA**

**Country of publication:** Serbia

**CP**

**Locality of publication:** AP Vojvodina

**LP**

**Publication year:** 2012

**PY**

**Publisher:** Author reprint

**PB**

**Publish place:** Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1

**PP**

**Physical description:** Chapters 6, pages 137, figures 33, tables 19,  
**PD** references 328.

**Scientific field:** Applied and Engineering Chemistry

**SF**

**Scientific discipline:** Biochemistry, Food biochemistry, Enzyme engineering

**SD**

**Subject, Keywords:** Plant globulins, enzymatic hydrolysis, enzymatic cross-linking  
**SKW** functional properties of proteins

**UC**

**Holding data:** Faculty of Technology Novi Sad (library),  
**HD** Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad

**Note:** None

**N**

**Abstract:**

**AB**

The PhD thesis research is aimed at development of different bioprocesses for modification of plant globulins in order to improve their functional properties. Studies are based on characterization and enzymatic modification of major storage protein (12S), cucurbitin derived from pumpkin oil seed (*Cucurbita pepo*). The base of research is enzymatic conversion of cucurbitin by hydrolase and transferase. Two different enzymatic processes are used for protein modification: (i) enzymatic hydrolysis and (ii) enzymatic cross-linking. To monitor, control the bioprocesses, and definition of process parameters, such as temperature, pH, enzyme-substrate ratio, reaction time, Response Surface Methodology (RSM) was used. In addition, RSM was employed for production of protein modification with desired functional properties.

**Accepted on Scientific**

**Board on:** 11.02.2011.

**AS**

**Defended:**

**DE**

**Thesis defend board:** Dr Verica Sovilj, Professor, Faculty of Technology,

**DB** Novi Sad, president

Dr Svetlana Trivić, Professor, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Novi Sad, member

Dr Draginja Peričin, Professor, Faculty of Technology,

Novi Sad, member



*Ova disertacija urađena je u laboratoriji odeljenja Biohemija i Enzimsko inženjerstvo, Katedre za primenjene i inženjerske hemije, na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu, pod mentorstvom Prof. dr Draginje Peričin.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem svom mentoru Prof. dr Draginji Peričin na ukazanom poverenju, prenesenom znanju, brojnim savetima i pomoći koje mi je pružila od prvog dana naše saradnje. Veliko hvala i na idejama i strpljivoj podršci tokom izrade doktorske disertacije.*

*Iskreno se zahvaljujem Prof. dr Svetlani Trivić i Prof. dr Verici Sovilj na kritičkom čitanju disertacije i dragocenim savetima i sugestijama.*

*Veliku zahvalnost dugujem kolegama sa predmeta Koloidna hemija na stručnoj saradnji i pruženoj pomoći u toku eksperimentalnog rada.*

*Posebno se zahvaljujem svojim saradnicama Senki Popović, Žužani Vaštag i Mileni Banović koje nisu samo moje kolegice već i iskreni prijatelji.*

*Koristim ovu priliku da se najsrdačnije zahvalim i svim drugim kolegama sa Tehnoškog fakulteta na saradnji i pomoći.*

*Mamin neizmeran trud i upornost i tatina vera u mene su razlog što sam danas ovo što jesam, hvala vam.*

*Ogromno hvala mojim momcima Milanu, Jovanu i Mihailu na strpljenju i ljubavi.*

## **Spisak publikacija proisteklih neposredno iz rada na doktorskoj disertaciji:**

1. Peričin, D., **Radulović, Lj.**, Trivić, S. and Dimić, E. (2008) Evaluation of solubility of pumpkin seed globulins by response surface method, *Journal of Food Engineering*, 84 (591-594).
2. **Popović, Lj.**, Peričin, D., Vaštag, Ž. i Popović, S. (2011) Optimization of enzymatic hydrolysis of cucurbitin using response surface methodology: Improvement of the Functional Properties, *International Journal of Food Engineering* 7 (5) Article 18
3. **Popović, Lj.**, Peričin, D., Vaštag, Ž. i Popović, S. (2011) Optimization of transglutaminase cross-linking of pumpkin oil cake globulin; Improvement of the solubility and gelation properties, *Food and Bioprocess Technology*, **DOI:** 10.1007/s11947-011-0673-9

## Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Cilj disertacije.....	2
<b>2. OPŠTI DEO</b> .....	3
2.1. Biljni proteini .....	3
2.1.1. Klasifikacija i izolovanje biljnih proteina.....	4
2.1.2. Biljni globulini.....	6
2.1.2.1. Kukurbitin-globulin semena uljane tikve ( <i>Cucurbita pepo</i> ).....	8
2.2. Funkcionalne osobine proteina .....	12
2.2.1. Funkcionalne osobine povezane sa hidratacionim mehanizmom.....	13
2.2.1. Funkcionalne osobine povezane sa strukturom i reološkim osobinama.....	17
2.2.1. Funkcionalne osobine povezane sa osobinama na površini molekula proteina....	18
2.3. Modifikovanje proteina.....	22
2.3.1. Hemijske modifikacije proteina.....	22
2.3.2. Enzimskie modifikacije proteina .....	31
2.3.2.1. Enzimsko hidroliza proteina .....	31
2.3.2.1.1. Funkcionalne osobine proteinskih hidrolizata .....	37
2.3.2.2. Enzimsko umrežavanje proteina.....	44
2.3.2.2.1. Transglutaminaze.....	44
2.3.2.2.2. Funkcionalne osobine umreženih proteina.....	48
2.4. Optimizacija procesa enzimske hidrolize i umrežavanja.....	51
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	55
3.1. Materijali.....	55
3.2. Enzimski ekstrakcioni proces .....	55
3.3. Vodeni ekstrakcioni proces.....	56
3.4. Priprema kukurbitina .....	56
3.5. Proces enzimska hidroliza .....	56
3.6. Određivanje stepena hidrolize (DH).....	57
3.7. Proces umrežavanja proteina .....	58
3.8. Određivanje stepena polimerizacije (DP).....	59
3.9. Određivanje funkcionalnih osobina proteina.....	59
3.9.1. Rastvorljivost.....	59
3.9.2. Emulziona aktivnost i stabilnost.....	59
3.9.3. Kapacitet i stabilnost pene .....	59

3.9.4. Adsorpcija ulja i vode.....	60
3.9.5. Želiranje.....	60
3.10. Određivanje antioksidativne aktivnosti proteinskih hidrolizata.....	60
3.10.1. Antiradikalska aktivnost prema ABTS <sup>•+</sup> radikal katjonu.....	60
3.10.2. Redukcija Fe <sup>3+</sup> jona - Redukujuća moć.....	62
3.11. SDS-gel elektroforeza.....	62
3.12. Statistička obrada podataka .....	62
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA.....</b>	<b>64</b>
4.1. Proteinski sastav semena uljane tikve.....	64
4.2. Izolovanje i komparativna ispitivanja funkcionalnih osobina kukurbitina dobijenog iz semena i pogače uljane tikve ( <i>Cucurbita pepo</i> ) .....	66
4.3. Optimizacija uslova za povećanje rastvorljivosti kukurbitina.....	70
4.4. Enzimska hidroliza kukurbitina .....	75
4.4.1. Gel elektroforeza.....	76
4.4. 2. Optimizacija i kontrola procesa enzimske hidrolize kukurbitina.....	79
4.4.3. Funkcionalne osobine hidrolizata kukurbitina .....	85
4.4.3.1. Rastvorljivost.....	85
4.4.3.2. Sposobnost formiranja emulzije.....	87
4.4.3.3. Adsorpcija ulja .....	88
4.4.3.4. Sposobnost formiranja pene.....	89
4.4.4. Antioksidativni dejstvo hidrolizata kukurbitina.....	95
4.5. Enzimsko umrežavanje kukurbitina.....	98
4.5.1. Modelovanje procesa enzimskog umrežavanja kukurbitina .....	98
4.5.2. Gel elektroforeza.....	105
4.5.3. Funkcionalne osobine umreženih proteina.....	105
4.5.3.1.Rastvorljivost.....	105
4.5.3.2.Sposobnost želiranja.....	107
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>109</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>112</b>

## **1. UVOD**

Proteini predstavljaju važne komponente u ljudskoj ishrani, kao glavni izvori azota i esencijalnih amino kiselina. Pored toga, proteini značajno doprinose fizičko-hemijskim, biološkim i senzornim svojstvima hrane. Zbog povećane cene i ograničene količine proteina životinjskog porekla za formulaciju hrane, u poslednje vreme, veliki interes (ekonomski i ekološki) je u iznalaženju novih izvora proteina. Pored biljnih izvora proteina sve veći naučni interes je usmeren na iskorišćenje nusproizvoda prehrambene industrije i njihovu valorizaciju za dobijanje visoko vrednih proizvoda na bazi proteina koji poseduju različite funkcionalne i biološke aktivnosti.

Funkcionalne osobine kao što su rastvorljivost, emulzione osobine, sposobnost formiranja pene, želiranje, vezivanje vode i ulja, obezbeđuju bitne informacije o proteinima u kojim formulacijama proizvoda u prehrambenoj ili drugoj industriji mogu naći primenu. Takođe, zavisno od funkcionalnih osobina, ponašanje proteina u formulacijama hrane tokom njenog procesovanja, skladištenja, kao i konzumiranja je različito. Poslednjih godina značajno rastu kriterijumi koji nalažu visok kvalitet proteina hrane. Posebno zbog zadovoljenja zahteva potrošača, metode za modifikaciju funkcionalnih karakteristika proteina su od sve većeg interesa, a sve u cilju razvijanja postupaka za dobijanje funkcionalne hrane.

Primena enzimskih metoda modifikacije proteina se pokazala kao uspešna za unapređenje karakteristika proteina, naročito zbog blagih uslova pri kojima enzimi deluju, za razliku od metoda zastupljenih pri hemijskim i fizičkim tretmanima. Generalno, enzimske metode modifikacije proteina mogu se podeliti na enzimsko umrežavanje (cross-linking) i enzimsku hidrolizu.

Umrežavanje proteina katalizovano enzimima ima značajan uticaj na promene u veličini, konformaciji, stabilnosti i drugim osobinama proteina. Primena ovih enzima u cilju modifikacije funkcionalnosti je veoma rasprostranjena na raznim izvorima proteina kao što su: miofibrilarni proteini, proteini mleka, soje, ribe i cerealija. Značajno mesto su našli u prehrambenoj industriji zbog njihovog uticaja na formiranje gelova, reološka svojstva, rastvorljivost, alergenost, zbog mogućnosti enkapsulacije lipida, kao i formiranja biodegradibilnih filmova.

Sa druge strane, enzimska hidroliza takođe dovodi do promena na molekulskom nivou: smanjenje molekulske mase, povećanje naelektrisanja, izlaganje hidrofobnih grupa na

površini i otkrivanje reaktivnih aminokiselinskih bočnih ostataka. Kao rezultat molekulskih promena dolazi i do promena funkcionalnih, nutritivnih i bioloških osobina proteina. Najznačajnije promene funkcionalnih osobina ogledaju se u rastvorljivosti, viskoznosti, emulzionim osobinama itd. Nutritivne promene su izražene u pogledu povećanja digestije i smanjenja alergnosti u poređenju s izvornim proteinom, a izraziti značaj enzimske hidrolize se ogleda u povećanju biološke aktivnosti proteina (peptida).

I u procesima enzimskog umrežavanja i enzimske hidrolize na svojstva i strukturu dobijenog proteinskog modifikata utiče više parametara: vrsta proteina (supstrata), enzima, reakcioni uslovi pri kojima se sam enzimski proces vodi. Zbog toga, primena novih analitičkih i kompjuterskih tehnika za definisanje i razvoj bioprocasa ima veliki značaj u naučnim istraživanjima usmerenim ka modifikaciji proteina u službi funkcionalne hrane.

## **1.1. Cilj disertacije**

Cilj disertacije je dobijanje proteinskih modifikata sa unapređenim funkcionalnim osobinama, kao komponenti hrane i razvoj enzimskih procesa modifikacije biljnih globulina.

Razvoj enzimskog procesa modifikacije globulina uljane tikve golicice (*Cucurbita pepo*), kukurbitina, je istražena sa dva aspekta: (I) enzimska hidroliza primenom proteolitičkih enzima i (II) enzimsko umrežavanje primenom enzima tipa transferaza (transglutaminaze). Istraživanja su usmerena ka dobijanju proteinskih modifikata ciljanih funkcionalnih karakteristika kontrolom i optimizacijom enzimskog procesa.

## **2. OPŠTI DEO**

### **2.1. Biljni proteini**

Zbog povećane cene i ograničene količine proteina životinjskog porekla za formulacije hrane, postoji veliki interes, ekonomski i ekološki, ka iznalaženju novih, biljnih, izvora proteina. Semena uljarica, cerealijska i leguminoza pokazali su se kao izvori proteina koji su najbolja alternativa proteinima životinjskog porekla. Biljni proteini, njihova karakterizacija, modifikacije i primena, u proteklih par decenija su predmet izučavanja mnogobrojnih naučnih radova.

Biljni proteini se odlikuju visokom nutritivnom vrednošću, koja se definiše aminokiselinskim sastavom i udelom esencijalnih aminokiselina u dozi preporučenoj od strane svetske zdravstvene organizacije. Za razliku od animalnih proteina (npr. kazein i albumin iz jajeta) koji, gledajući sa nutritivnog aspekta, sadrže izbalansiran sastav esencijalnih aminokiselina, biljni proteini, generalno, oskudevaju u pojedinim aminokiselinama. Proteini žitarica (pšenice, ječma, ovasa, riže, kukuruza) oskudevaju u lizinu i triptofanu, dok proteini leguminoza i uljarica (soja, pasulj, kikiriki, uljana tikva, heljda, konoplja, lan) imaju nedostatak sumpornih aminokiselina - metionin i cistein (Mandal i Mandal, 2000). Premda su proteini pojedinih biljnih vrsta deficitarni u pojedinim esencijalnim aminokiselinama, ovaj nedostatak može biti lako nadomešten dodatkom proteina drugih biljnih izvora (Moure i sar., 2006a). Prisustvo antinutritivnih komponenti kao što su enzimski inhibitori, takođe, utiču značajno na nutritivni kvalitet biljnih proteina (Fukushima, 1991).

Pored toga, biljni proteini, zbog svojih specifičnih fizičko hemijskih osobina, predstavljaju dobre funkcionalne komponente koje utiču na određene karakteristike proizvoda kao što su: tekstura, konzistencija, organoleptičke karakteristike i dr. Takođe, poseduju i određene biološke aktivnosti, zbog čega imaju potencijal za primenu u proizvodima farmaceutske i kozmetičke industrije, kao i na polju funkcionalne hrane (Clemente, 2000; Wang i sar., 2008; Zhu i sar., 2006; Li i sar., 2007; Cumby i sar., 2008; Yoshie-Stark i sar., 2008).

Posle soje, kao najviše eksploatisane biljne vrste za proizvodnju različitih komercijalnih proteinskih proizvoda, poslednjih godina sve veća pažnja je usmerena ka proteinima poreklom i iz drugih leguminoza, semena uljarica, žitarica i nus-produkata njihove prerade (Moure i sar,

2006a). Razne vrste pasulja (El-Adawy, 2000), graška (Heng, 2005), suncokret (González-Pérez i Vereijken, 2007), uljana repica (Chabanon i sar., 2007; Yoshie-Stark i sar., 2008), kikiriki (Govindaraju i Srinivas, 2006), semena biljaka porodice *Cucurbitaceae* (uljane tikve, lubenice) (El-Soukkary, 2001; El-Adawy i Taha, 2001; Peričin i sar., 2005) i razne žitarice predstavljaju značajne izvore proteina. Kao novi izvori proteina sve više se koriste nusproizvodi agro i prehrambene industrije (uljane pogače suncokreta, uljane repice, uljane tikve i slično) čime se postiže njihova valorizacija u visoko vredne proteinske proizvode (Moure i sar., 2006a; Yu i sar., 2007; Chabanon i sar., 2007; Peričin i sar., 2007; Peričin i sar., 2009a).

### 2.1.1. Klasifikacija i izolovanje biljnih proteina

#### **Klasifikacija**

Biljni proteini se, najšire gledano, mogu podeliti u dve kategorije: (i) metabolički aktivni tzv. „housekeeping“ proteini koji su zaduženi za održavanje normalnog ćelijskog metabolizma i (ii) rezervni proteini („storage proteins“) (Millerd, 1975). Prema kasnijoj klasifikaciji proteini se dele na rezervne, strukturne i biološki aktivne proteine (Fukushima, 1991). Glavni biološki aktivni proteini su enzimski inhibitori. Inhibitori proteaza prisutni su najčešće kod leguminoza, dok kod žitarica osim inhibitora proteaza prisutni su i inhibitori  $\beta$ -amilaze. Neke sorte pasulja i graška sadrže proteine koji imaju funkciju sličnu lektinu (Pernollet i Mosse, 1983). Rezervni biljni proteini, s druge strane, nemaju biološku funkciju i imaju jedinu svrhu kao izvori azota i sumpora tokom procesa klijanja i razvoja biljke. Takođe, rezervni proteini su najzastupljeniji u semenu, te stoga, imaju najveći uticaj na nutritivne osobine kao i mogućnost procesiranja same biljke. Proteini koji se svrstavaju u kategoriju rezervnih („seed storage proteins“) su oni koji se: akumuliraju u semenu u velikim količinama, hidrolizuju na sastavne aminokiseline tokom procesa klijanja i poseduju visok nivo aminokiselina bogatih azotom (Lambert i Yarwood, 1992).

Biljni proteini su klasifikovani pre mnogo godina prema Osbornu (1924) na osnovu njihove rastvorljivosti na sledeće kategorije:

Albumini: rastvorljivi u vodi;

Globulini: rastvorljivi u rastvorima soli određene jonske jačine;

Prolamini: rastvorljivi u alkoholu;

Glutelini: najteže rastvorni; rastvaraju se u kiselim ili baznim rastvorima ili u prisustvu SDS.



Albumini i globulini čine glavne proteine dikotiledonih biljaka (leguminoze i uljarice), dok prolamini i glutelini su glavni proteini monokotiledonih (cerealije) (Mandal i Mandal, 2000).

Druga osnova za klasifikaciju biljnih proteina je prema koeficijentu sedimentacije, koji se određuje ultracentrifugiranjem. Tip pufera, pH i jonska jačina predstavljaju uticajne faktore na vrednost sedimentacionog koeficijenta, zbog čega se mogu sresti različite vrednosti za proteine iste biljne vrste i izvora (Gonzales-Perez i Vereijken, 2007). Uglavnom su albumini 2S tip, dok se globulini mogu podeliti u dve posebne klase, 7S i 11/ 12 S (Wright, 1988). Globulini tipa 11/ 12 S dominantni su kod dikotiledonih biljnih vrsta (Pernollet i Mosse, 1983).

### *Izolovanje*

U procesu izolovanja biljnih proteina značajnu ulogu ima vrsta izvora proteina, prethodni procesi nad izvornom sirovinom i način i uslovi izolovanja i prečišćavanja. Zbog različitog kvaliteta proteina u biljnim izvorima, ne postoji univerzalni postupak, već se uslovi i načini izolovanja moraju prilagoditi vrsti izvora i prirodi proteina koji se žele izolovati (Dominguez i sar., 1994; Rosenthal i sar., 1996).

U biljnom materijalu proteini su, obično, vezani sa ostalim neproteinskim komponentama: oligosaharidima, polifenolima, fitinskom kiselinom i drugim antinutrijenima (tripsin inhibitori, tanini), koji ometaju sam proces izolovanja proteina i njihovo prisustvo ograničava mogućnost primene proteina kao ingredijenata hrane (Mour i sar., 2006a). Različiti tretmani, kao što su: hidrotermički tretman, vodeno natapanje, fermentacija i klijanje, se koriste u svrhu uklanjanja antinutrijenata kao predtretmani u izolovanju proteina. Klijanjem, kombinovano sa termičkim tretmanom, uspešno se otklanjaju problemi kao što su nepoželjan miris i ukus kao i tripsin inhibitori, povećava se proteinski sadržaj i otklanjaju se nesvarljivi oligosaharidi i antinutritijenti (Suberbie i sar., 1981; Dagnia i sar., 1992). Izolovanje nativnih proteina iz semena može biti unapređeno primenom komercijalnih enzimskih preparata („cell wall degrading enzymes“) koji razgrađuju kompleksnu strukturu ćelijskih zidova: pektinske materije, polisaharide ili i same proteine. Ovaj enzimski kompleks se uglavnom sastoji od pektinaza, celulaza, hemicelulaza i proteaza (Dominguez i sar., 1994). Ovakvim postupcima omogućeno je dobijanje kvalitetnih ulja iz semena uljarica i proizvodnje proteinskih koncentrata ili izolata, sa manjim oštećenjima nativnih proteina (Bocevska i sar., 1994; Rosenthal i sar., 2001)

Komercijalno, ekstrakcija i prečišćavanje biljnih proteina izvodi se u neutralnim ili kiselim rastvorima za produkciju koncentrata (48-70% proteina) ili u alkalnim rastvorima za dobijanje izolata (85-90% proteina). Proteinski koncentri nastaju nakon uklanjanja neproteinskih komponenti (rastvorljivi minerali, ugljeni hidrati, antinutritivni faktori) iz punomasnog ili obezmašćenog mlevenog biljnog materijala. Vrsta procesa značajno utiče na kvalitet i osobine koncentrata. Produkcija izolata se sastoji od vodene ekstrakcije proteina i ugljenih hidrata u neutralnoj ili alkalnoj sredini zatim selektivnog izdvajanja rastvorenih proteina, ispiranja, neutralizacije i na kraju sušenja. Faktori kao što su vrednost pH, prisustvo soli i njihova koncentracija, jonska jačina medijuma, naelektrisanje i elektrostatička odbijanja značajno utiču na prinos i osobine proteinskog izolata (Barker i sar., 2002; Newkirk i sar., 2003).

Procesi za dobijanje proteinskih frakcija (albumina, globulina) obuhvataju parcijalnu separaciju i odvajaju se sukcesivnom diferencijalnom ekstrakcijom prvo sa vodom, zatim rastvorom soli, alkoholnim rastvorom i na kraju kiselo/baznim rastvorom. Tako frakcionisani proteini se dalje prečišćavaju kombinacijom metoda kao što su toplotno ili izoelektrično taloženje, taloženje amonijum sulfatom, gel filtracija i jonoizmenjivačka hromatografija. Za dalju separaciju koriste se tehnike: izoelektrično fokusiranje, dvodimenzionalna i kapilarna elektroforeza i HPLC (tečna hromatografija pod visokim pritiskom) (Burg i Van den Burg, 1996; Capelli i sar., 1998).

### **2.1.2. Biljni globulini**

Biljni globulini predstavljaju dominantnu proteinsku frakciju u biljnim vrstama koje nisu žitarice („non-cereal grains“). Sa nutritivnog aspekta imaju znatno izbalansirani sastav u odnosu na prolaminsku frakciju, koja je dominantna kod žitarica (Portyanko i sar., 1997). Iako globulini čine jedan od glavnih sastojaka dikotiledonih biljaka (leguminoze i uljarice) oni se isključivo dobijaju kao sekundarni nus-proizvodi u toku procesuiranja tih biljnih vrsta (semena). Tradicionalno, semena uljarica, kao što su soja, kikiriki, suncokret se koriste prvenstveno u procesu dobijanja jestivih ulja, dok uljana pogača sa visokim proteinskim sadržajem zaostaje i koristi se u ishrani životinja. Međutim u razvijenim zemljama, te uljane pogače se koriste kao izvori globulina, u obliku proteinskih izolata, koji su našli svoje mesto na tržištu kao ingredijenti hrane (Fukushima, 1991; Uzzan, 1998). Najveću primenu su našli kao substituenti mesa u mesnoj industriji, u proizvodima kao što su kobasice, hamburgeri i sl.,

gde imaju ulogu u snižavanju sadržaja masti i povećanju proteinskog sastava, ali iznad svega, u smanjenju cene proizvoda (Rutkowski i Gwiazda, 1986). Biljni proteinski izolati, takođe, se primenjuju kao agensi za formiranje pena i emulzija u mnoštvu prehrambenih proizvoda, kao što su pekarski i mlečni proizvodi, kao zamena za skuplje animalne proteinske komponente dobijene iz jaja i mleka (van Vliet i sar., 2002; Schwenke, 2001).

Iako su mnoga istraživanja pokazala da se globulini mogu podeliti u dve različite klase - 7S i 11/12S, na bazi njihovog koeficijenta sedimentacije, ipak je 11/12S klasa dominantna forma kod dikotiledonih biljaka (Lambert i Yrwood, 1992). Zbog toga je značajno veći naučni interes usmeren na karakterizaciji ove globulinske frakcije.

#### *Fizičko-hemijske osobine biljnih globulina*

Karakterizacija fizičko-hemijskih osobina biljnih globulina predstavlja, najčešće, komplikovan proces zbog efekata koji imaju pH, jonska jačina i redukujući agensi na njihovu molekulsku konformaciju, veličinu i strukturu. Relativno lako narušavanje molekulske strukture globulina dokazuje da je većina veza između polipeptidnih lanaca nekovalentnog karaktera, npr. vodonične, elektrostatičke, hidrofobne, polarne i van der Waals-ove veze (Carrasco i sar., 1998). Dokazano je da male promene u vrednosti pH dovode do raskidanja veza i narušavanja molekulske strukture. Globulini 11/12S tipa dobijeni iz semena kikirikija, pasulja, graška i dr. pokazuju reverzibilnu disocijaciju polipeptidnih lanaca u zavisnosti od pH. Generalno, biljni 11/12 S globulini imaju najveću konformacionu stabilnost na pH vrednostima između 6-9 (Marcone i sar., 1998a). Nasuprot tome, u kiseloj sredini globulini gube tercijarnu strukturu dok sekundarna struktura ostaje nepromenjena (Marcone i sar., 1998b).

Drugi faktor koji ima značajan uticaj na mogućnost purifikacije i karakterizacije biljnih globulina je jonska jačina rastvora. Usled promene jonske jačine rastvora ovi proteini imaju mogućnost reverzibilnog i ireverzibilnog procesa asocijacije/disocijacije. Pri malim jonskim jačinama (manje od 0.1 mol/l) najčešće dolazi do agregacije 11S globulina u 14S ili 19S globuline (Naismith, 1955). Eksperimentalni podaci ukazuju da 11S globulini ekstrahovani i karakterisani u 0.5-1 mol/l rastvoru natrijum hlorida u fosfatnom puferu imaju veću strukturalnu stabilnost nego oni u rastvorima male jonske jačine (Marcone i sar., 1997a).

Uobičajena molekulska masa 11/12S globulina se kreće u intervalu od 300-370 kDa, mada često može da se razlikuju vrednosti u zavisnosti od metoda korišćenih u procesu ekstrakcije proteina. Globulini 11/12S tipa su oligomeri, najčešće sadrže 6 podjedinica (heksameri) koje

su nekovalentno vezane. Svaka podjedinica se sastoji od jednog kiselog i jednog baznog peptidnog lanca, čije molekulske mase se kreću oko 30-39 kDa i 20-27 kDa, respektivno. Sekundarnu strukturu čine u manjoj mjeri  $\alpha$ -heliks dok je  $\beta$ -sheet struktura zastupljenija (Marcone, 1999). Takođe je zapaženo da u zavisnosti od zastupljenosti određene sekundarne strukture globulini imaju različite temperature denaturacije. Tako da uglavnom svi globulini, zbog manjeg sadržaja  $\alpha$ -heliks strukture u odnosu na  $\beta$ -sheet, imaju relativno visoke temperature denaturacije ( $T_D$  od 83-107°C) (Marcone i sar., 1997b). Za razliku od velike sličnosti u sekundarnoj strukturi između 11/12S globulina iz različitih biljnih vrsta, u tercijarnoj strukturi se razlikuju, prvenstveno zbog različitog aminokiselnog sastava. Zbog toga se globulini odlikuju različitim funkcionalnim osobinama koje prvenstveno zavise od naelektrisanja i hidrofobnosti amino kiselina na površini molekula (Marcone, 1996).

Najznačajnije, u literaturi izučavane, globulinske frakcije imaju svoje trivijalne nazive: glicinin (11S) i  $\beta$ -konglicinin (7S) iz soje, kruciferin (12S) globulin uljane repice, edestin (11S) globulin semena konoplje, arašin (11S) iz kikirikija i lešnika, helantin (11S) iz suncokreta, kukurbitin (12S) iz semena uljane tikve itd.

Modifikacijom ovih proteina hemijskim i enzimskim tretmanima dolazi do značajnih promena funkcionalnih, nutritivnih i bioloških osobina, zbog čega su našli veliku primenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i drugim industrijama (Clemente, 2000; Fukushima, 1994; Uzzan, 1988) o čemu će biti više rečeno u narednim poglavljima.

### **2.1.2.1. Kukurbitin-globulin semena uljane tikve (*Cucurbita pepo*)**

Uzgajanje uljane tikve (*Cucurbita pepo*) je široko rasprostranjeno na prostorima Austrije, Slovenije, Mađarske, Hrvatske i Vojvodine. Primarno, uljana tikva se gaji radi semena koje je bogato uljem. Pored visokog procenta ulja, 40 – 51%, u zavisnosti od sorte, seme sadrži visok procenat proteina, 30 – 40%, zatim, sadržaj ukupnih ugljenih hidrata se kreće od 10 do 20%, dok je voda zastupljena sa oko 5%. Ima oko 2% mineralnih materija kao i pektina. Bogato je vitaminima rastvorljivim u ulju (D, K i PP), vitaminima B1 i B2, fosfornom i salicilnom kiselinom i fenolnim komponentama (Robinson, 1975; Lazos, 1986; Winkler, 2000, Peričin i sar., 2009b). Seme je dobar izvor magnezijuma, mangana, fosfora i fitosterola. Prema narodnoj medicini koristi se za lečenje benigne hiperplazije (dobročudnog uvećanja) prostate. Takođe, preporučuje se i kao antihelmitik. Visok sadržaj vitamina A i C,

kao i hidroksi kiselina redukuje tragove starenja kože. Seme tikve sadrži i vitamin E koji je značajni antioksidant (Robinson, 1975; Reiterer i Reiterer, 1994; Pleh i sar., 1998; Teppner, 2004, Sener i sar., 2007). Pečeno seme uljane tikve sa ljuskom nazvane "semenke" najčešće se koriste za direktno konzumiranje i takav način korišćenja semena tikve posebno je karakterističan za područje Balkana i Bliskoistočnih zemalja (Berenji, 1999).

Ulje dobijeno iz semena uljane tikve (tikvino ulje), po kvalitetu, nutritivnim svojstvima i farmakološkom delovanju je odmah posle maslinovog ulja. Tikvino ulje dobija se procesom "hladnog ceđenja" hidrauličnim ili pužnim presama, isključivo bez upotrebe hemikalija, odnosno organskih rastvarača. Nakon procesa izdvajanja ulja, kao nus-proizvod zaostaje uljana pogača, koja se uglavnom koristi za stočnu ishranu. Međutim, zbog svog visokog sadržaja proteina (60 %), uljana pogača može biti uspešno iskorišćena i za ljudsku ishranu. Izdvajanje proteina iz ovog nus-proizvoda se pokazalo kao način za valorizaciju uljane pogače u visoko vredne proteinske produkte (Peričin i sar., 2009b; Popović i sar., 2010; Vaštag i sar., 2010, Popović i sar., 2011). Slično, i drugi nus-proizvodi prehrambene i agro-industrije bili su predmet izučavanja kao vredni izvori proteina za formulacije hrane i kao funkcionalni agensi (Damodaran i Paraf, 1997; Ahmedna i sar., 1999; Yu i sar., 2007; Wu i sar., 2009).

U poslednje vreme velika pažnja istraživača usmerena je na izučavanje nutritivnih i zdravstvenih vrednosti proteina iz semena biljaka iz familije *Cucurbitaceae* (Ng i sar., 2002; Tongyi i sar., 2003; Wang i Ng, 2003). Proteini semena uljane tikve, pokazuju farmakološke aktivnosti kao što su antifungalno (Wang i Ng, 2003), antibakterijsko i antiinflamatorno (Caili i sar., 2006), zatim ACE inhibitorno i antioksidantno (Nkosi i sar., 2006; Vaštag i sr., 2011) delovanje. Proteini ekstrahovani iz prokljalog semena biljaka iz familije *Cucurbitaceae* predstavljaju hipoglikemske supstance (Caili i sar., 2006). Takođe, dokazano je da dodavanjem proteina iz semena uljane tikve dolazi do *in vitro* poboljšanje digestije proteina u hlebu (El-Soukkary, 2001).

U semenu uljane tikve, najzastupljenija proteinska frakcija je 12 S globulini (Marccone i sar., 1997a; Peričin i sar., 2006). Rezervni proteini semena uljane tikve smešteni su u proteinskim telašcima, to su 12 S globulin-kukurbitin i 2S albumini (Hara-Nishimura i sar., 1982). Kukurbitin glavni rezervni protein semena uljane tikve, izolovan je u kristalnoj formi i opisan je pre mnogo vremena (Osborne, 1914). Oko definisanja strukture i veličine kukurbitina, u početku, bilo je dosta neusaglašenosti u naučnoj literaturi. Mourgue i saradnici (1968) su definisali tri komponente sa glavnom frakcijom koja ima molekulsku masu 340

kDa; Hara i saradnici (1976) su tvrdili da je kukurbitin dimer molekulske mase 112 kDa; Pichl (1976) je sugerisao da je tetramer molekulske mase 230 kDa, dok su Koler i saradnici (1979), takođe tvrdili da je tetramer ali molekulske mase 240 kDa. Većina ovih rezultata bila je u suprotnosti sa vrednostima dobijenim za 11/12S globuline iz drugih semena, za koje je, generalno, dokazano da su heksameri molekulskih masa od 300 do 400 kDa. Blagrove i Lilley (1980) su nakon toga detaljno okarakterisali kukurbitin iz različitih vrsta biljaka iz familije *Cucurbitaceae*, koristeći se primenom različitih analitičkih metoda kao što su ultrafiltracija, gel hromatografija i SDS gel elektroforeza. Definisali su molekulsku težinu, broj podjedinica kao i elektroforetsku heterogenost polipeptida u podjedinicama. Njihovi rezultati su kasnije potvrđeni od strane drugih autora u naučnoj literaturi (Marccone i sar., 1997a, Marccone, 1999).

Prema istraživanjima Blagrove i Lilley (1980) kukurbitin se jednostavnim postupkom izdvaja i prečišćava zahvaljujući osobini da se taloži na neutralnim vrednostima pH (pH= 7.0), pri umerenoj jonskoj jačini rastvora, dok su ostali proteini semena pri ovim uslovima rastvorljivi. Takođe, dokazano je da je kukurbitin oligomer molekulske mase 325 kDa, da se sastoji od šest sličnih, ali ne identičnih podjedinica molekulske mase 54 kDa. Dvodimenzionalnom SDS elektroforezom je utvrđeno da se svaka podjedinica sastoji od dva disulfidno vezana polipeptidna lanca, kiseli i bazni, molekulskih masa 33 kDa i 22 kDa, respektivno. Značajna heterogenost u naelektrisanju prisutna je u oba polipeptidna lanca. Dodatna komponenta koja je detektovana sedimentacionom analizom je mali procenat (<10%) 18S frakcije, za koju je utvrđeno da predstavlja dimer 12 S komponenti (Blagrove i Lilley, 1980).

**Tabela 1.** Amino kiselinski sastav kukurbitina iz semena uljane tikve (*Cucurbita pepo*)

(Marccone i sar., 1997a)

A.k.	Asx <sup>a</sup>	Thr	Ser	Glx <sup>b</sup>	Pro	Gly	Ala	Cys	Val
%	9.1	2.7	8.5	17.3	10.4	7.1	6.8	1.5	4.6

A.k.	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Trp
%	1.7	3.2	6.6	2.6	4.7	2.7	1.9	10.1	NO

<sup>a</sup>Asx=Asp+Asn

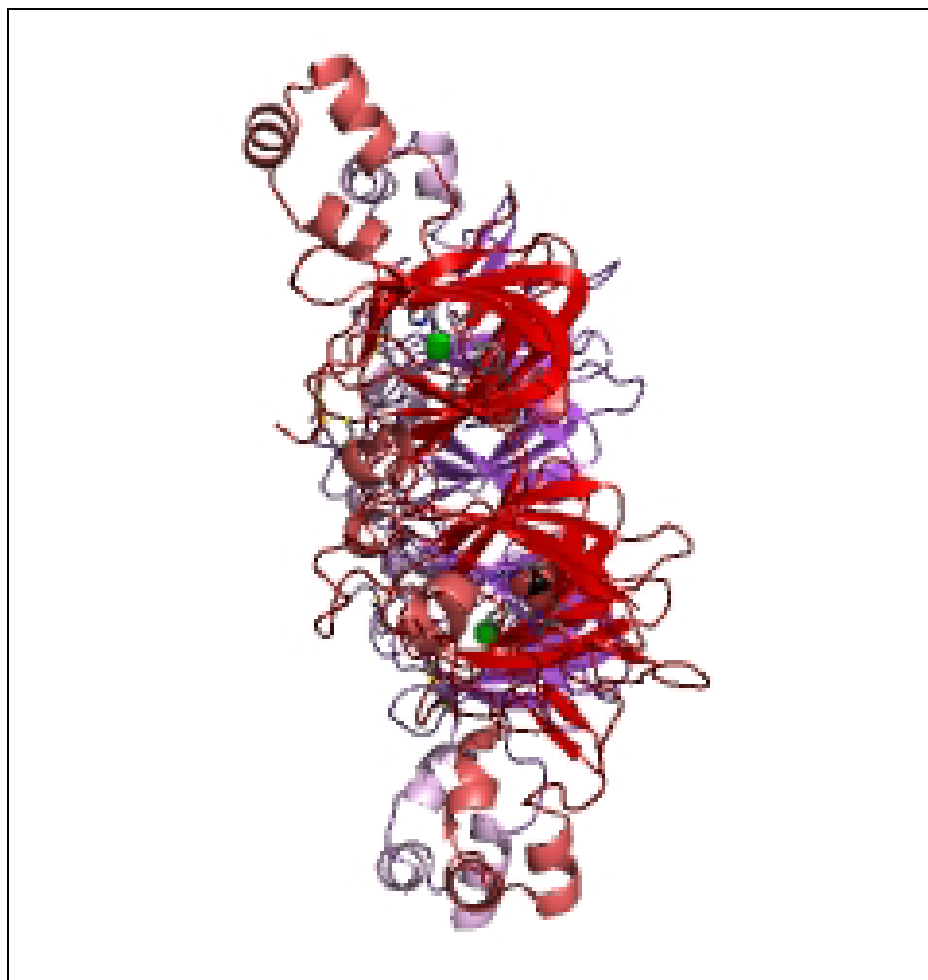
<sup>b</sup>Glx=Glu+Gln

NO, nije određen

Amino kiselinski sastav kukurbitina ukazuje na visok sadržaj arginina, glutaminske i asparaginske kiseline (Hara i sar., 1976). Marccone i saradnici (1997a) su odredili amino

kiselinski sastav kukurbitina iz semena uljane tikve (*Cucurbita pepo*), što je prikazano u Tabeli 1.

Trodimenzionalna struktura kukurbitina kao heksamera prikazana je na Slici 1.



**Slika 1.** 3D struktura kukurbitina (www.ebi.ac.uk)

U naučnoj literaturi gotovo da i nema radova o osobinama kukurbitina i o njegovoj potencijalnoj primeni u prehrambenim i drugim proizvodima. Parcijalnom hidrolizom, primenom tripsina, ispitana je digestija kukurbitina iz semena tikve (*Cucurbita moschata*). Kao produkt reakcije dobija se tkz. kukurbitin-T, izolovan kao homogeni protein molekulske mase 285 kDa. U poređenju sa nativnim, kukurbitin-T je pokazivao nižu vrednost izoelektrične tačke i veću rastvorljivost. Elektroforezom je utvrđeno da enzimski tretman ima veći uticaj na kiseli peptidni lanac, dok bazni ostaje, skoro, nepromenjen (Blagrove i sar., 1981).

## **2. 2. Funkcionalne osobine proteina**

Proteini ne predstavljaju samo esencijalne nutritijente važne u ishrani, već su podjednako važni i u pogledu svojih funkcionalnih svojstava, koja doprinose senzornim karakteristikama u formulacijama hrane. Pod funkcionalnim svojstvima proteina hrane podrazumevaju se fizičko-hemijska svojstva proteina koja utiču na ponašanje proteina tokom proizvodnje, skladištenja, pripreme i konzumiranja hrane (Kinsella, 1976). Prema Damodaran-u (1997) funkcionalne osobine su definisane kao fizičko-hemijske osobine (veličina, oblik, aminokiselinski sastav i sekvenca, naelektrisanje, hidrofilnost i hidrofobnost, struktura) molekula proteina koje utiču na njegovo funkcionalno ponašanje u hrani uslovljeno uslovima okoline ili interakcijom sa drugim konstituentima hrane.

Funkcionalne osobine mogu biti klasifikovane na osnovu mehanizma delovanja u tri osnovne grupe (Moure i sar., 2006a):

- (i) Svojstva povezana sa hidratacionim mehanizmom (rastvorljivost, kapacitet zadržavanja i vezivanja vode i ulja);
- (ii) Svojstva povezana sa strukturom i reološkim osobinama (viskozitet, elastičnost, agregacija, želiranje, filmogena svojstva);
- (iii) Svojstva povezana sa osobinama na površini molekula proteina (emulzione osobine, svojstva formiranja pene).

Funkcionalne osobine obezbeđuju bitne informacije o proteinima u kojoj formulaciji proizvoda u prehrambenoj industriji mogu naći primenu. Proteini se u hrani ponašaju kao stabilizatori emulzija i pene, agensi za zadržavanje vode, vezivanje ulja i teksturizaciju i u tom smislu, imaju ulogu prirodnih aditiva (Sikorski, 2006). Peptidi, oligopeptidi i aminokiseline mogu značajno doprinosti i formiranju specifičnog ukusa ili boje u namirnicama (Kunst, 2003). Pojedini proteini mogu ispoljavati jedno značajno funkcionalno svojstvo, dok drugi mogu ispoljavati više korisnih svojstava istovremeno, odnosno biti multifunkcionalni. U Tabeli 2. prikazana su najznačajnija funkcionalna svojstva proteina hrane u nekim prehrambenim proizvodima.



**Tabela 2.** Najznačajnija funkcionalna svojstva proteina hrane (Mahmoud, 1994)

<b>Funkcionalne osobine</b>	<b>Način delovanja</b>	<b>Primena u formulacijama hrane</b>
<b>Rastvorljivost</b>	Rastvaranje proteina	Napici, namirnice tečne konzistencije
<b>Vezivanje vode</b>	Vezivanje molekula vode vodoničnim vezama	Meso, kobasice, hleb, keks
<b>Viskozitet</b>	Ugušćivanje, vezivanje vode	Supe, sosevi, prelive
<b>Želiranje</b>	Formiranje proteinskog matriksa	Mesni proizvodi, sirevi, deserti na bazi gela
<b>Emulgovanje</b>	Formiranje i stabilizacija emulzija ulja u vodi	Mleko, majonez, salatni prelive i dresinzi
<b>Adsorpcija ulja</b>	Vezivanje slobodnih masti	Meso, kobasice, krofne
<b>Formiranje pene</b>	Formiranje stabilnih filmova na kontaktnoj površini gas-tečno	Sladoled, razni filovi, šlag, topljeni sirevi

### 2.2.1. Funkcionalne osobine povezane sa hidratacionim mehanizmom

#### *Rastvorljivost proteina*

Rastvorljivost proteina se, najčešće, definiše kao procenat ukupnih proteina koji može biti ekstrahovan vodom ili odgovarajućim rastvaračem pri određenim uslovima. Rastvorljivost proteina u vodenim sistemima zavisi prvenstveno od hidrofilnog/hidrofobnog balansa na površini molekula, što je predodređeno primarnom strukturom proteina i konformacijom. Generalno, proteini bogati ostacima jonizujućih amino kiselina, sa malim udelom hidrofobnih grupa na površini su dobro rastvorljivi u vodi i slanim rastvorima. Stepem jonizovanosti bočnih aminokiselinskih grupa na površini molekula direktno zavisi od pH sredine i zato se, pod definisanim uslovima, pH može smatrati faktorom od najvećeg uticaja na rastvorljivost proteinskih molekula. Takođe, na rastvorljivost imaju uticaj jonska jačina i temperatura u posmatranom sistemu kao i priroda proteina (Fennema, 1982; Golovanov i sar., 2004). Denaturacija proteina može da smanji rastvorljivost, termalna denaturacija praćena agregacijom, zbog interakcija izloženih reaktivnih grupa dovodi do smanjenja rastvorljivosti.

### *Faktori koji utiču na rastvorljivost proteina*

*Uticaj pH* se odražava na naelektrisanje i elektrostatički balans između molekula proteina, kao i između proteina i rastvarača. Na pH vrednostima iznad i ispod izoelektrične tačke, proteini su naelektrisani (negativno, odnosno pozitivno, respektivno) i samim tim stvaraju interakcije sa molekulima vode što povećava i rastvorljivost. U blizini izoelektrične tačke protein je u obliku cviter jona, interakcije sa vodom su minimalne, dolazi do agregacije i precipitacije molekula proteina, pa rastvorljivost ima minimalnu vrednost. Rastvorljivost proteina u funkciji pH vrednosti uglavnom ima V- ili U-oblik (Cheftel i sar., 1985). Rastvorljivost proteina je uglavnom veća u alkalnom nego u kiselom području pH vrednosti, zbog većeg broja negativno naelektrisanih aminokiselinskih ostataka u alkalnom području od pozitivno naelektrisanih u kiselom području (Fennema, 1993). Veća rastvorljivost u alkalnoj sredinini je razlog zbog koga se ekstrakcija proteina uglavnom izvodi pri pH vrednostima 10 -12. Na ekstremima pH vrednostima, protein se denaturiše i prevodi u aglomerate i značajno mu se smanjuje rastvorljivost (CP kelco, 2004).

### *Uticaj temperature*

Pri konstantnim vrednostima pH i jonske jačine, rastvorljivost proteina se povećava sa povećanjem temperature od 0°C do oko 50°C. Na temperaturama višim od 50°C, dolazi do narušavanja sekundarne i tercijarne strukture (Cheftel i sar., 1985) i javlja se denaturacija proteina (Dixon i Veb, 1979). Denaturacija dovodi do agregacije proteina i smanjenja rastvorljivosti što se i odražava na druge funkcionalne osobine (Diosady i sar., 2007; Marnoch, 2004), dok ne utiče na nutritivni kvalitet proteina. Prema Cheftel i sar. (1985), svako sledeće povećanje temperature za 10°C rezultira oko 600 puta veću brzinu denaturacije proteina. Agregacija je povećana ako je protein izložen termičkom delovanju na pH vrednosti svoje izoelektrične tačke (Cheftel i sar., 1985;. Savolainen, 2004).

### *Uticaj jonske jačine*

Rastvorljivost proteina može značajno da bude izmenjena u zavisnosti od jonske jačine rastvarača ( $\mu$ ) koja je definisana jednačinom (1):

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n (C_i Z_i^2) \quad (1)$$

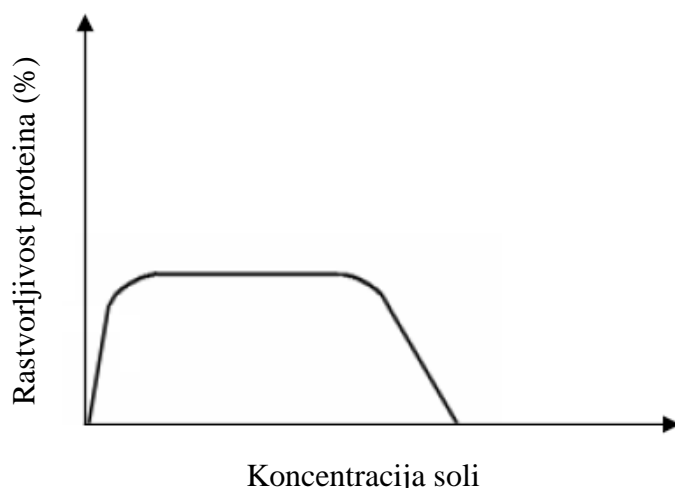
gde je  $C$  koncentracija rastvora,  $Z$  je valenca (Cheftel i sar., 1985). Jonske interakcije između površine proteina, vode i solvatiranih jona rastvarača može se povećati primenom nekoliko tretmana: formiranjem zaštitnog koloida na površini proteina sa polielektrolitima, dodajući naelektrisane rastvarače u rastvor, ili modifikovanjem proteina tako da se im se poveća hidrofilitnost.

Dodavanjem soli u rastvor proteina dolazi do značajnih promena rastvorljivosti zbog nastalih elektrostatičkih interakcija između naelektrisanih proteina i jona u rastvoru (Charalambous i Doxastakis, 1989). Poznavanje jonske jačine jedne vrste jona u rastvoru nije dovoljno da bi se predvideo njihov uticaj na rastvorljivost proteinskih molekula, jer različiti joni imaju različiti efekat na konformaciju proteina, a samim tim i na rastvorljivost. Neki joni izazivaju taloženje proteina (usoljavanje “salting out”) dok drugi povećavaju rastvorljivost proteina (“salting in”) (Mizubiti i sar., 2000). Za predviđanje promena rastvorljivosti proteina uslovljene promenom koncentracije soli koristi se poluempirijska Cohn-ova jednačina (2) (Esdal, 1947).

$$\log \frac{C'_s}{C_s} = \beta + K_s \cdot I \quad (2)$$

Gde su:  $C_s$  i  $C'_s$  rastvorljivost proteina u vodi i rastvoru soli, respektivno;  $\beta$  je udeo rastvorljivosti proteina na izolektričnoj tački;  $K_s$  je konstanta i  $I$  je jonska jačina rastvora. U slučaju kada je  $K_s$  ima pozitivnu vrednost tada rastvorljivost proteina raste sa porastom koncentracije soli (“salting in”), a kada je  $K_s$  negativna onda rastvorljivost proteina opada sa porastom koncentracije soli (“salting out”). Za klasifikaciju jona prema svojoj sposobnosti za “salting in” ili “salting out” proteina postoji empirijski dokazan niz, nazvan Hofmeister-ov niz. Prema ovom nizu NaCl ima sposobnost za “salting in” proteina, dok s druge strane,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  je poznata po sposobnosti precipitacije proteina (Iyer i Przybycien, 1994). Joni koji povećavaju rastvorljivost proteina u interakciji su sa naelektrisanim grupama na površini molekula proteina i na taj način smanjuju elektrostatičko privlačenje između suprotno naelektrisanih susednih proteinskih lanaca ili molekula. Takođe, kada ovi solvatisani joni dođu u interakciju sa proteinima dolazi do povećanja njihove solvatacije (Cheftel i sar., 1985).

Joni kojima se postiže “salting in” proteina imaju tu sposobnost samo do određene koncentracije, (Slika 2) (Snow, 2007). Generalno, koncentracije pri kojima neutralne soli povećavaju rastvorljivost proteina, kreću se od 0.5 do 1 mol/l. Pri koncentracijama većim od 1 mol/l, rastvorljivost proteina se smanjuje i može doći do precipitacije.



**Slika 2.** “Salting in” i “salting out” proteina kao funkcija koncentracije soli (Snow, 2007).

“Salting out” nastaje usled kompeticije između proteina i jona soli za solvataciju molekulima vode. Pri visokoj koncentraciji soli, većina molekula vode preferira vezivanje sa jonima soli, ostavljajući proteine nesolvatisane. Usled toga dolazi do protein-protein interakcije što vodi ka agregaciji i, u nekim slučajevima, ka precipitaciji. Ova agregacija je uglavnom reverzibilne prirode i ne izaziva denaturaciju proteina, naročito ako se dešava pri niskim temperaturama (Cheftel i sar., 1985; Ellinger, 1972).

### ***Kapacitet vezivanja i zadržavanja vode i ulja***

Radi primene proteina u formulacijama hrane gde postoje interakcije protein-voda veoma je važno poznavati prirodu i količinu vode koja je vezana za proteinske molekule pod definisanim uslovima: kapacitet zadržavanja, odnosno vezivanja vode. Kapacitet zadržavanja vode/ulja se odnosi na sposobnost zadržavanja vode/ulja protiv gravitacije i uključuje vezanu vodu, hidrodinamičku i kapilarnu vodu, kao i fizički zarobljenu vodu. Količina vode vezana za proteine zavisi od prirode amonikiselinskih ostataka na površini molekula i raste sa povećanjem broja naelektrisanih bočnih grupa (glutaminske i asparaginske kiseline),

konformacije, pH, temperature, jonske jačine i koncentracije proteina (Moure i sar., 2006). Kapacitet vezivanja vode proteina veoma utiče na reološka svojstva sistema (Panyam i Kilara, 1996).

### **2.2.2. Funkcionalne osobine povezane sa strukturom i reološkim osobinama**

#### ***Želiranje***

Želiranje je prelazni proces između čvrstog i tečnog (Moure i sar., 2006) i predstavlja formiranje strukturne mreže, stabilnog oblika, određene mehaničke čvrstoće i viskoelastičnosti (Panyam i Kilara, 1996). Do želiranja dolazi usled smanjenja interakcije voda-protein i povećanja interakcije protein-protein, koji nastupaju kao rezultat delovanja spoljašnjih faktora: toplote, promene pH ili jonske jačine. U procesu želiranja dolazi do parcijalne denaturacije proteina, otvaraju se native strukture proteina, čime se omogućava interakcija i umrežavanje proteinskih lanaca. Važni faktori koji utiču na proces želiranja su koncentracija proteina, priroda (veličina, fleksibilnosti i sklonosti proteina da podležu denaturaciji), kao i inicijalni stepen denaturisanosti proteina (Panyam i Kilara, 1996). Većina globularnih proteina formira gelove usled termičke denaturacije. Karakteristike formiranog gela, čvrstoća, brzina želiranja, mikrostruktura mogu biti kontrolisani izborom uslova želiranja. Dve vrste gela, transparentni ili čestičasti, se mogu formirati u zavisnosti od vrste proteina, aminokiselinskog sastava i uticaja pH i jonske jačine. Proteini koji sadrže nepolarne ostatke uglavnom formiraju čestičaste gelove, dok transparentni gelovi nastaju od proteina hidrofилnog karaktera (Shimada i Matsushita, 1980). Reološka merenja se najčešće primenjuju za ispitivanja prirode i osobina gela. Sposobnost proteina da formira gelove se tradicionalno meri određivanjem veličine minimalne koncentracije za formiranje gela (Least gelation concentration, LGC).

#### ***Filmogena svojstva proteina***

Formiranje proteinskih filmovi sastoji se iz tri koraka: (i) denaturacija proteina usled fizičkih ili hemijskih agenasa (rastvaranje ili termički tretman) čime proteinski lanci postaju mobilni; (ii) orijentacija proteinskih lanaca u željenu formu; (iii) agregacija proteina formiranjem novih intermolekulskih veza i interakcija u novu trodimenzionalne strukturu. Stabilnost strukture

povećavaju hidrofobne interakcije, vodonične veze, disulfidne veze, itd (Cuq, 2002). Faktori koji utiču na tok agregacije su vrsta proteina i pH vrednost rastvora. Filmovi se obično formiraju na pH vrednostima rastvora daleko od izoelektrične tačke (Sikorski, 2003). Najčešće korišćen proces formiranja filmova sastoji se iz razgradnje i rastvaranje proteina u različitim rastvaračima, zatim sledi kalupljenje rastvora i, na kraju, sušenju. Osobine dobijenih filmova zavise od vrste proteina, njihove koncentracije, uslova rastvaranja, dodatka plastizera itd. Molekuli plastizera su neophodni za proizvodnju filmova, jer se njihovim dodavanjem izbegava krtost filmova koja je rezultat formiranja snažnih veza između molekula proteina (Anuchit, 2006). Plastizeri koji se najčešće koriste za proizvodnju proteinskih filmova su glicerol, polietilen glikol, sorbitol, propilen i etilen glikol, neki monosaharidi, disaharidi i oligosaharidi, lipidi i njihovi derivati (Yang i Paulson, 2000; Irissin-Mangata i sar., 2001). Uopšteno, dodavanjem plastizera smanjuje se mehanička otpornost filmova, a raste elastičnost i propustljivost vodene pare.

### **2.2.3. Funkcionalne osobine povezane sa osobinama na površini molekula proteina**

#### ***Formiranje i stabilnost emulzije i pene***

Pene i emulzije predstavljaju koloidne sisteme u kojima je jedna faza (gas u slučaju pene i ulje kod emulzija tipa ulje u vodi) dispergovana u drugoj fazi. Iako su i pene i emulzije disperzni sistemi i imaju sličan proces formiranja i stabilizacije, postoji nekoliko važnih razlika u fizičkom pogledu. Mehurovi gasa su veći ( $\approx 10^3$  puta), značajno stišljiviji ( $\approx 10^5$  puta) i osetljiviji na spoljašnje uticaje (kao što su promena temperature, isparavanje itd.) u odnosu na emulzije kapljice. Takođe, rastvorljivost dispergovane faze u kontinualnoj fazi, kao i razlike u gustini su veće kod pena nego emulzija (Walstra, 1987; Dickinson, 1992).

Za formiranje pena i emulzija, mehurovi odnosno kapljice, respektivno, moraju biti generisani i razbijeni u sitnije delove. Razbijanje ovih čestica zahteva velike količine energije koja treba da savlada Laplace-ov pritisak ( $p_L$ ), koji se opire deformaciji i razbijanju mehurova ili kapljica. Laplace-ov pritisak definiše se sledećom jednačinom (3)

$$p_L = 2\gamma/R \quad (3)$$

gde je  $\gamma$  površinski napon [N/m], a R je prečnik čestice[m]. U toku procesa formiranja pene ili emulzije proteini, ili neki drugi surfaktant, se adsorbuju na površinu čestica i snižavaju međupovršinski napon čime se postiže razbijanje mehurova ili kapljica (Walstra i Smulders, 1997). Surfaktanti imaju još jednu ulogu u procesu formiranja pene i emulzije – sprečavaju neposrednu rekoalescenciju čestica svojom sposobnošću formiranja  $\gamma$ -gradienta.

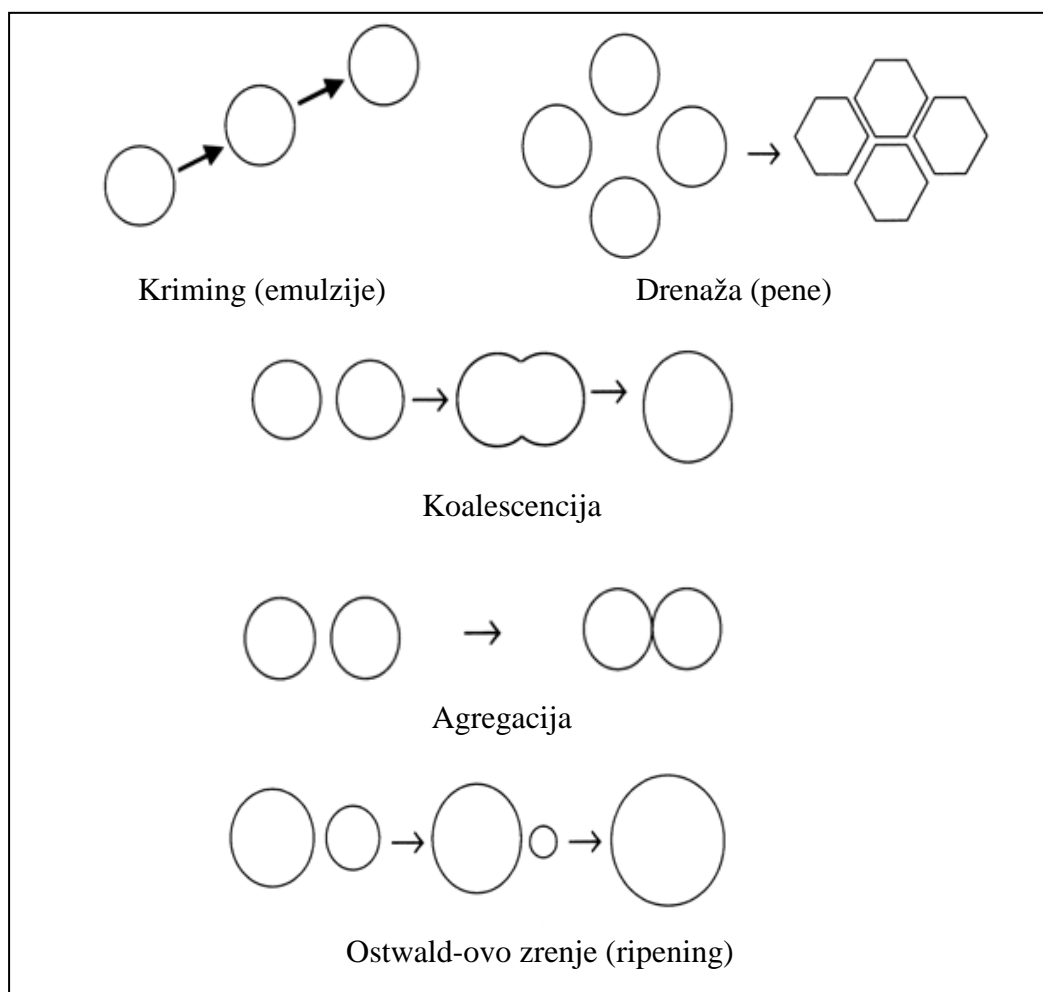
Potencijal za formiranje  $\gamma$ -gradienta raste sa porastom površinskog dilatacionog modula  $E_{SD}$  (Lucassen, 1981), koji je definisan sledećom jednačinom (4):

$$E_{SD} = d\gamma/d \ln A \quad (4)$$

Gde je  $A$  [m<sup>2</sup>] površina.  $E_{SD}$  odražava interakcije između molekula proteina i površine (Burnett i sar., 2002). Takođe, brzina adsorpcije surfaktanta i viskozitet kontinualne faze imaju značajan uticaj na proces formiranja i stabilizacije pene i emulzije (Halling, 1981).

Pene i emulzije su izložene promenama usled različitih mehanizama nestabilnosti (Slika 3). Kriming i drenaža se dešavaju kao posledica razlike u gustini među fazama. Veličina čestica i viskozitet kontinualne faze ima uticaj na brzinu kriminga i drenaže.

Ostwald-ovo zrenje je, verovatno, najvažniji vid nestabilnosti kod proteinskih pena, dok ima mali značaj u emulzijama tipa ulje u vodi. Pokretačku snagu čine razlike u Laplace-ovom pritisku na zakrivljenoj površini mehura, što rezultira većom rastvorljivošću gasa oko malih mehurova u odnosu na veće, kao što je i opisano Henry-jevim zakonom. U principu, Ostwald-ovo zrenje može biti usporeno ili stopirano ako surfaktant ostane adsorbovan na površini skupljenog mehura gasa, jer bi se tad površinski pritisak smanjio usled smanjenja površine. Odnos između površinskog pritiska i promene u površini definisan je sa  $E_{SD}$ . Ostwald-ovo zrenje kod pena bilo bi u potpunosti zaustavljeno kada bi bila zadovoljena sledeća relacija:  $E_{SD} \geq \gamma/2$  (Lucassen, 1981). Agregacija (ili flokulacija) je proces u kome se čestice grupišu u celinu. Agregacija u suštini nema veliku ulogu kod pena, dok je glavni uzrok nestabilnosti emulzija. Intezitet međusobnih sila između dve čestice zavisi od rastojanja između kapljica i debljine filma. Stoga, balans privlačnih i odbojnih sila među kapljicama utiče na agregaciju. Koalescencija se dešava ukoliko je film između dve čestice pukao, te se čestice udružuju u jednu veću (Walstra, 1996). Svi navedeni vidovi nestabilnosti imaju međusoban uticaj jedni na druge.



**Slika 3.** Mehanizmi nestabilnosti kod pena i emulzija (Preuzeto od Gonzales-Perez, 2003)

Mnogi prehrambeni proizvodi su u formi pene ili emulzije i često proteini imaju značajnu ulogu u stabilizaciji takvih sistema. Proteini predstavljaju dobre prirodne emulgatore zbog svoje amfipatične prirode koja im omogućuje da se orijentišu na polarnoj-nepolarnoj graničnoj površini, adsorbuju na graničnoj površini dve faze i formiraju i stabilizuju emulzije. Dobri stabilizatori pena se moraju brzo adsorbovati na graničnoj površini, imati brze konformacione promene i preuređenje na kontaktnoj površini gas-tečno (voda) sa osobinom da smanjuju površinski napon i formiraju viskoelastične kohezione filmove, putem intermolekularnih interakcija (Moure i sar., 2006a). Većina proteina, rastvorljivih u vodi spontano se adsorbuje na tečnim međupovršinama snižavajući Gibbs-ovu slobodnu energiju



na granici faza. Gibbs-ova slobodna energija adsorpcije  $\Delta G_{\text{ads}}$  [J] obuhvata entalpiju  $\Delta H_{\text{ads}}$  [J] i entropiju  $\Delta S_{\text{ads}}$  [J/K] (5):

$$\Delta G_{\text{ads}} = \Delta H_{\text{ads}} + T\Delta S_{\text{ads}} \quad (5)$$

gde je T [K] temperatura. Promena  $\Delta G_{\text{ads}}$  uglavnom potiče od promena entropije, dok promene u entalpiji su relativno neznatne. Povećanje entropije na granici faza dešava se usled promene konformacione entropije proteina i promena u strukturi vode u blizini hidrofobnih grupa (Mangino, 1994; Damodaran, 1997; Martin, 2003). Proteini se uglavnom adsorbuju na granici faza preko svojih hidrofobnih segmenata (Smulders, 2000). Adsorbovani proteini razmotavaju svoju strukturu, reorjentišu se i formiraju novu energetski najpogodniju konformaciju (German and Phillips, 1991; Dickinson, 1994). Faktori koji utiču na ovaj proces su lokalno naelektrisanje i koncentracija proteina (Martin, 2003). Molekulske osobine kao što su: konformaciona stabilnost/fleksibilnost, površinska hidrofobnost i molekulska masa utiču na sposobnost proteina da smanji međufazni napon tokom formiranja pena i emulzija, odnosno omogući formiranje malih čestica (Wagner i Guéguen, 1999; Smulders, 2000; Martin, 2003). Nakon formiranja pene i emulzije, proteini u adsorbovanom omotaču održavaju sterna i elektrostatička odbijanja, koja stabilizuju čestice i sprečavaju pojave agregacije, kriminga i koalescencije (Halling, 1981; Prins, 1988). Za stabilnost proteinske pene, smatra se da je veća na pH vrednostima bliskim izoelektričnoj tački (Bacon i sar., 1988; German i Phillips, 1991). Suprotno tome, emulzije su znatno stabilnije u pH oblastima dalje od izoelektrične tačke adsorbovanog proteina, a gube stabilnost smanjenjem elektrostatičkog odbijanja (Halling, 1981). Faktori koji još utiču na sposobnost emulgovanja proteina su, jonska jačina i temperatura. Promena pH se odražava na promene hidrofobnosti i površinskog naelektrisanja kao i na rastvorljivost proteina. Joni utiču na elektrostatičke interakcije, konformaciju i rastvorljivost proteina. S druge strane, temperatura može da poveća emulgujuću moć tako što zagrevanjem na 40-60°C dolazi do razmotavanja proteinske strukture i želiranja zaštitnog filma.

Faktori čijom interakcijom je uslovljena sposobnost formiranja pene su priroda proteina, molekulska masa, hidrofobnost/ hidrofilnost, stabilnost konformacije, naelektrisanje, pH, temperatura i jonska jačina. Indeks emulzione aktivnosti (EAI) i stabilnosti (ESI) su najčešći parametri koji služe za karakterizaciju proteina kao emulgatora. Veličine kojima se proteini karakterišu kao sredstva za formiranje pene su kapacitet pene (FC) i stabilnost pene (FS).

## 2. 3. Modifikovanje proteina

Veliki broj nativnih proteina ne poseduje funkcionalne osobine poželjne za njihovu primenu u formulacijama gotovih proizvoda. Modifikovanje proteina je način za unapređenje njihovih nutritivnih i funkcionalnih vrednosti (Panyam i Kilara, 1996). Takođe, procesom modifikacije mogu se ukloniti toksične ili inhibitorne komponente, inkorporirati nutritivi i aditivi putem kovalentnog vezivanja i povećati stabilnost proteinskog proizvoda.

Modifikacija proteina može biti izvedena hemijskim putem, enzimske putem i usled fizičkih tretmana. Modifikacije proteina u cilju promene i unapređenja funkcionalnih karakteristika podrazumevaju:

- a) modifikacija slobodnih bočnih nizova aminokiselina u strukturi proteina uklanjanjem pojedinih atomskih grupa ili ugradnjom heterokonstituenta;
- b) umrežavanje proteina;
- c) smanjenje veličine molekula, odnosno proizvodnja niskomolekularnih proteinskih hidrolizata (Moure i sar., 2006).

### 2.3.1. Hemijske modifikacije proteina

Relativno male promene u strukturi proteina izazvane hemijskim modifikacijama često su praćene značajnim fizičkim i biološkim promenama proteina. Hemijske modifikacije proteina se ogledaju u promenama hemijske strukture bočnih nizova aminokiselina. Osnovni cilj hemijskih modifikacija je da se ostvari promenjena struktura proteina, koja uslovljava i omogućuje ispoljavanje poželjnih funkcionalnih karakteristika. Promene osobina proteina dešavaju se usled promena ukupnog naelektrisanja na površini, kao i hidrofobnosti i sternih efekata u molekulu proteina, uslovljenih promenama na aminokiselinskim ostacima (Sikorski, 2006). Osim za poboljšanje funkcionalnih svojstava proteina, hemijske modifikacije se koriste i u fundamentalnim ispitivanjima strukture proteina i izučavanjima mehanizama delovanja enzima.

Uspešnost hemijske modifikacije jednog aminokiselinskog ostatka zavisi od prirode (reaktivnosti) bočnog niza, položaja (pristupačnosti) u molekulu proteina, polarnosti i naelektrisanja okolnih bočnih aminokiselinskih ostataka, reakcionih uslova i karakteristika modifikujućeg agensa (Kester i Richardson, 1984).

Na bočnim ostacima aminokiselina mogu se izvesti različite hemijske modifikacije. One su prikazane u Tabeli 3.

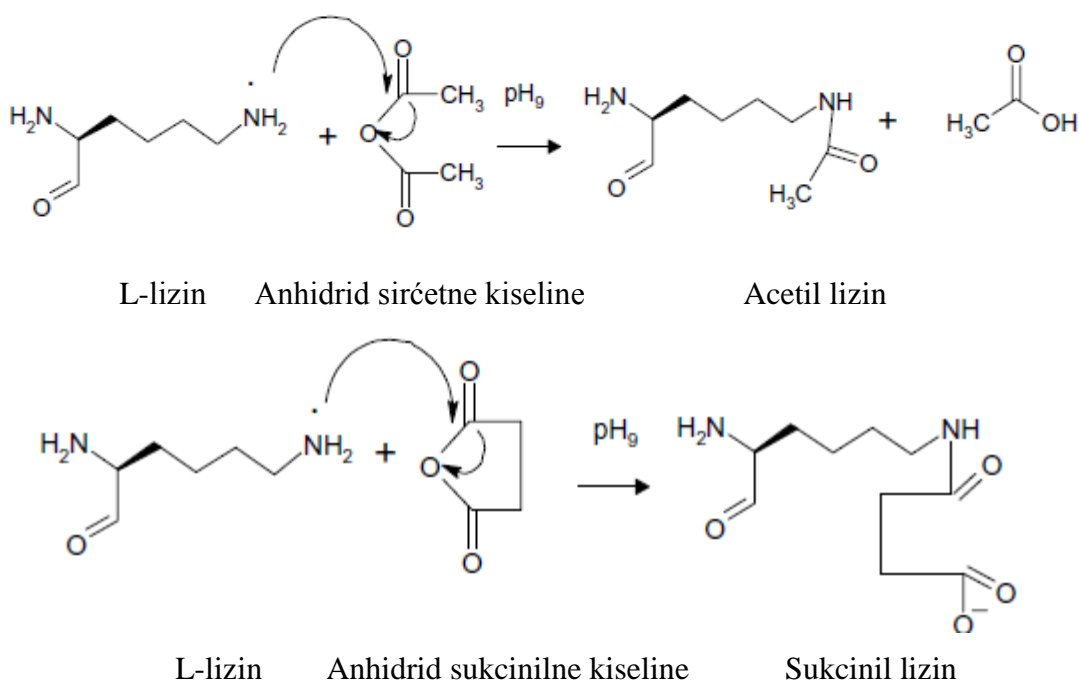
**Tabela 3.** Najznačajnije hemijske modifikacije na ostacima aminokiselina u proteinima (preuzeto od Kester i Richardson, 1984).

<b>Bočni ostaci aminokiselina</b>	<b>Modifikacija</b>
<b>Amino grupa</b>	<b>Alkilovanje, acilovanje</b>
<b>Karboksilna grupa</b>	<b>Esterifikacija, amidacija</b>
<b>Imidazol</b>	<b>Oksidacija, alkilovanje</b>
<b>Indolov prsten</b>	<b>Oksidacija, alkilovanje</b>
<b>Fenil grupa</b>	<b>Acilovanje, elektrofilna supstitucija</b>
<b>Disulfidni mostovi</b>	<b>Redukcija, oksidacija</b>
<b>Sulfhihirilna grupa</b>	<b>Alkilovanje, oksidacija</b>

Iako se hemijskim modifikacijama postižu pozitivne promene funkcionalnih osobina proteina, one nemaju široku komercijalnu primenu u prehrambenoj industriji. Hemijske modifikacije proteina prvenstveno nisu poželjne zbog oštih uslova reakcije, nespecifičnosti hemijskih agenasa i poteškoća prilikom uklanjanja reagensa iz finalnih produkata. Inkorporacija hemijski modifikovanih proteina u formulacijama hrane zahteva uvođenje regulative radi zaštite zdravlja potrošača. Takođe, može doći do smanjenja nutritivne vrednosti modifikovanih proteina zbog otežane digestije (Panyam i Kilara, 1996).

### **Acilovanje**

Jedna od najšire korišćenih hemijskih modifikacija proteina u cilju unapređenja funkcionalnih osobina je acilovanje (Dua i sar., 1996). Može se izvoditi sa anhidridima karbonskih kiselina: anhidridom sirćetne kiseline (acilovanje) i sa anhidridima dikarbonskih kiselina: sukcinilne (sukcinilizacija), maleinske, ftalne kiseline. U reakciji proteina sa anhidridima kiselina dolazi do acilovanja  $\epsilon$ -amino grupe lizinskih ostataka i N-terminalnih amino grupa polipeptidnih lanaca (Slika 4).



**Slika 4.** Šematski prikaz reakcije anhidrida sirćetne i sukcinilne kiseline sa  $\epsilon$ -amino grupom lizina u molekuli proteina

Usled reakcije proteina sa anhidridom sirćetne kiseline dolazi do eliminacije pozitivnog naelektrisanja lizinskog ostatka i srazmernog povećanja elektronegativnosti. Acilovanje sa anhidridima sukcinilne i drugih dikarbonskih kiselina dovodi do zamene pozitivnog naelektrisanja negativnim na lizinskom ostatku u proteinu. Takođe, zapaženo je da acilacija proteina, u nekim slučajevima, povećava elektrostatička odbijanja u molekulu proteina što dovodi do ekspanzije u molekulu (Johnson i Brekke, 1983). Gubitak i promena naelektrisanja može dovesti do delimičnog otvaranja proteinskih molekula i usled toga do povećanja rastvorljivosti, smanjenja vrednosti pI i veće termotabilnosti.

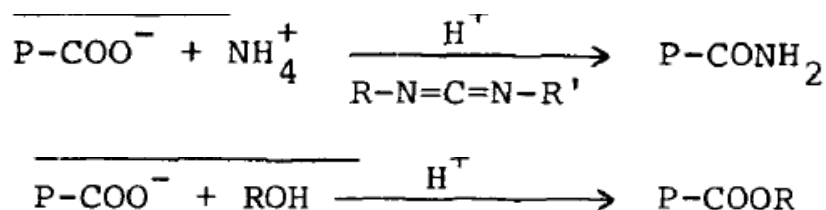
Acilovani proteini, generalno, imaju veću rastvorljivost od nativnih. Ova vrsta modifikacija primenjena je na velikom broju proteinskih izolata, koji su u osnovi globulinske frakcije, poreklom iz semena leguminoza (Lawal i Adebawale, 2004; Lawal i Adebawale, 2006), soje (Franzen i Kinsella, 1976), suncokreta (Kabirullah i Wills, 1982), uljane repice (Dua i sar., 1996).

Acilovanje dovodi i do povećanja adsorpcije vode i ulja kod proteinskog izolata soje i globulina uljane repice-kruciferina, kao i emulgujuće aktivnosti glicinina (Kim i Rhee, 1990) i arašina-11S globulina lešnika (Shyama i sar., 1982). Značajne promene u funkcionalnosti

proteina vezuju se za dužinu trajanja hemijskog tretmana. Tako produženim delovanjem dolazi do porasta hidrofobnosti molekula glicinina, dok umereno acetilovani glicinin odlikuje niska hidrofobnost (Kim i Rhee, 1989). Kontrolom stepena acilovanja mogu se varirati funkcionalne osobine proteina, što je i dokazano na proteinima soje.

### Amidacija i esterifikacija

Većina proteina ima vrednost izoelektrične tačke oko pH=5.0 i imaju negativno naelektrisanje na neutralnom pH. Ovo negativno naelektrisanje, u molekulu proteina, može se smanjiti modifikacijom negativno naelektrisanih bočnih grupa aminokiselina. Karboksilna grupa ostataka glutaminske i asparaginske kiseline može biti blokirana amidacijom ili esterifikacijom. Amidacija se izvodi ugradnjom amonijum jona, čime se karboksilni ostaci prevode u amide, odnosno glutaminska i asparaginska kiselina konvertuju u glutamin i asparagin. Estrifikacija karboksilne grupe glutaminske i asparaginske kiseline izvodi se u alkoholnom-HCl medijumu (Slika 5).



Slika 5. Reakcije amidacije i esterifikacije proteina

Reakcije modifikacije glutaminske i asparaginske kiseline su poželjnije, u cilju unapređenja funkcionalnosti proteina koji ulaze u sastav namirnica, u poređenju sa modifikacijama lizinskih ostataka, jer je lizin esencijalna aminokiselina (Kester i Richardson, 1984).

### Deamidacija

Suprotan proces amidaciji je deamidacija, koja predstavlja hidrolizu amidne grupe asparagina i glutamina. Deamidacija je jedna od najatraktivnijih hemijskih metoda za promenu strukture i osobina proteina iz cerealija (Malabat i sar., 2001).

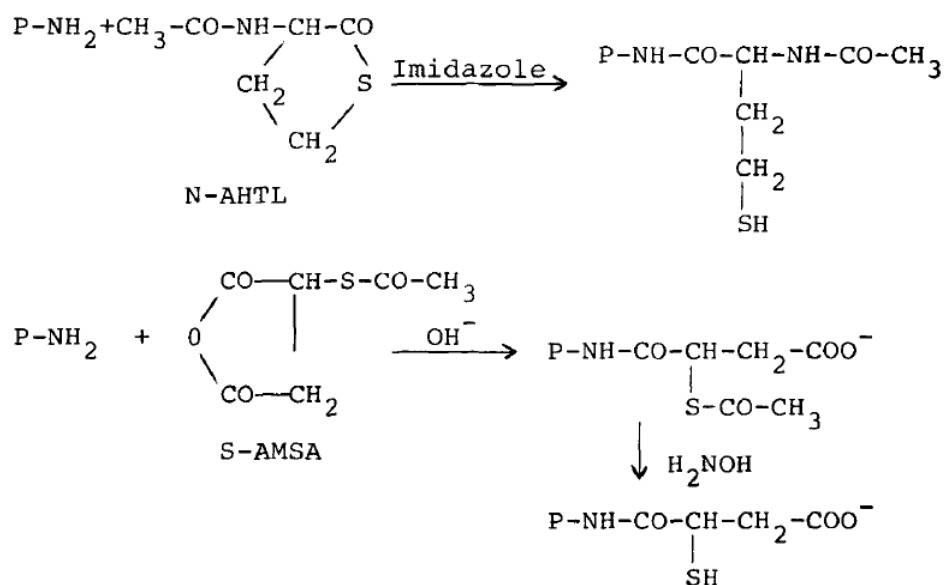
Hidrolizom amidne grupe ostaje slobodna karboksilna grupa. Nastala promena naelektrisanja odražava se na promenu konformacije koja dovodi do veće rastvorljivosti proteina. U toku kisele deamidacije može doći do delimične hidrolize peptidnih veza, što dodatno povećava rastvorljivost modifikovanih proteina. Kod bazne deamidacije može doći do cepanja disulfidnih mostova cisteina i do formiranja poprečnih veza formiranjem lizinoalanina (Yong i sar., 2006). Kiselna i bazna deamidacija su jedne od najuobičajenijih tehnika za povećanje rastvorljivosti glutena (Day i sar., 2006). Zao i saradnici (2010) su dokazali da procesom deamidacije dolazi do promena strukture, rastvorljivosti, osobina pene i sposobnosti emulgovanja globulina semena ječma. Takođe su dokazali, da stepen deamidacije ima veliki uticaj na bolju funkcionalnost proteina. Niži stepen deamidacije je poželjniji za dobijanje proteinskog modifikata sa unapređenim funkcionalnim osobinama. Slično je dokazano i kod proteina iz drugih izvora: soje, kukuruza, pirinča (Liao i sar., 2010; Martinez i sar., 2007; Paraman i sar., 2007).

### **Fosforilacija**

Hemijska fosforilacija proteina se može izvesti različitim agensima: fosfor oksihloridom ( $\text{POCl}_3$ ), fosfor-pentoksidom rastvorenim u fosfornoj kiselini, cikličnim Na-trimetafosfatom, monofenil fosfohlorid i dr (Li i sar., 2010). Fosforilacija proteina podrazumeva uvođenje fosfatnih grupa na bočne aminokiselinske ostatke: hidroksilnu grupu serina i treonina, - amino grupu lizina i imidazolov prsten histidina. Kovalentno vezani fosfatni ostaci na molekuli proteina menjaju hidrofilitnost molekula i povećavaju negativno naelektrisanje. Prisustvo fosfatnih grupa menja karakter interakcija između vode i proteina, pa samim tim i njihove funkcionalne osobine. Fosforilacija se pokazala kao uspešna metoda za povećanje rastvorljivosti glicinina (Zhang i sar., 2007), proteinskog izolata uljane repice (Krause i sar., 2002). Poboljšanje osobina želiranja, uključujući čvrstinu, gustinu i kapacitet vezivanja vode, fosforilisanih proteina može biti objašnjeno postojanjem uniformne mreže u gelu indukovane uvođenjem fosfatnih grupa (Li i sar., 2005; Li i sar., 2004). Kato i saradnici (1990) navode da unapređenje emulzionih osobina modifikovanih proteina nastaje usled povećanja površinske hidrofobnosti i smanjenja koalescencije usled elektrostatičkih odbijanja zbog uvođenja negativnog naelektrisanja koje potiče od fosfatne grupe (Li i sar., 2005). Hemijska fosforilacija je široko korišćena, međutim, fosforilisani proteini hrane nisu prihvaćeni od strane potrošača niti su poželjni u formulacijama hrane (Li i sar., 2010).

## Tiolizacija

Tiolizacija praktično podrazumeva reakcije kovalentnog vezivanja nove sulfhidrilne grupe u molekulu proteina. Modifikujući agensi mogu biti N-acetilhomocistein tiolakton (N-AHTL) ili S-acetilmerkaptosukcinil anhidrid (S-AMSA) (Slika 6.).

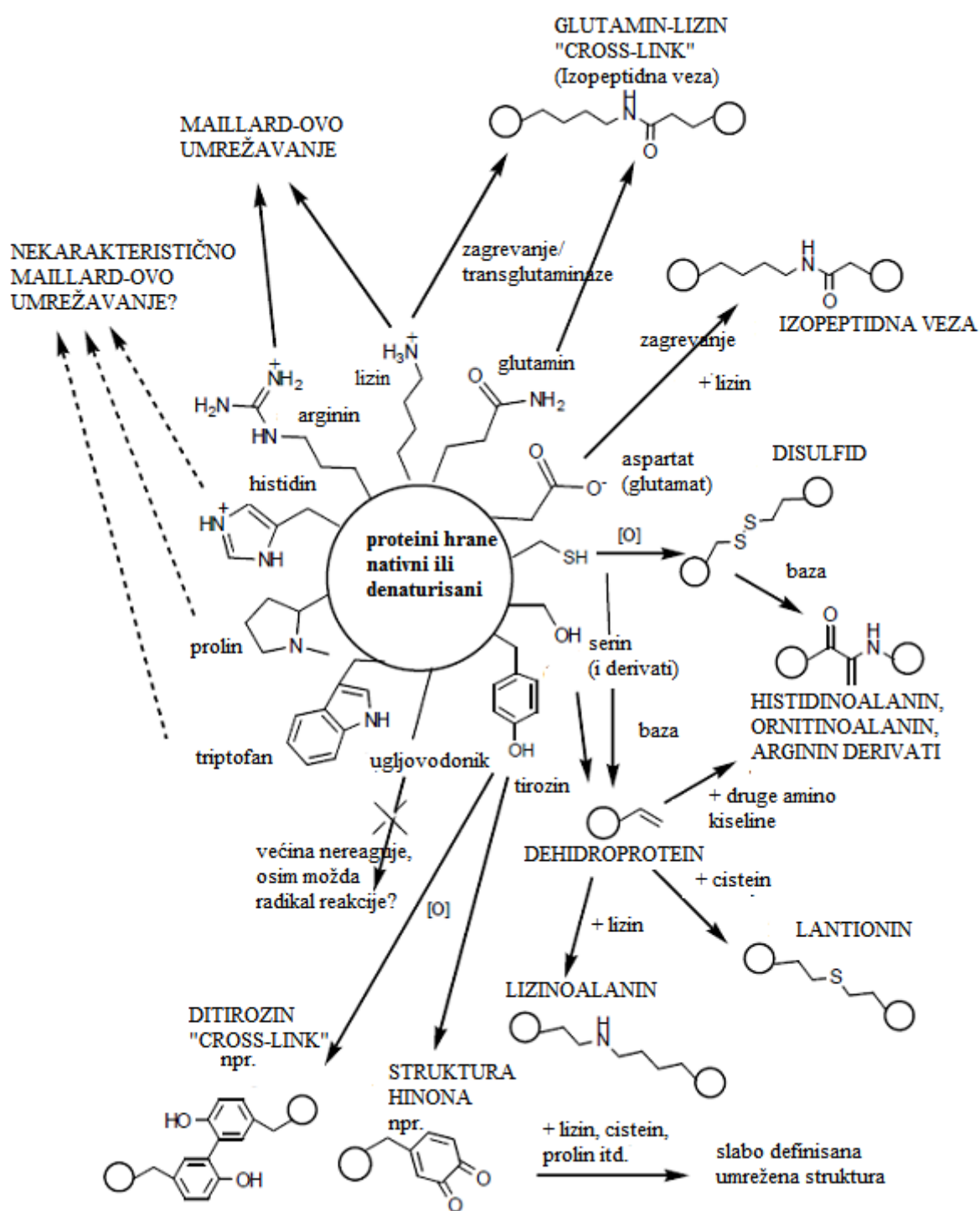


Slika 6. Reakcije tiolizacije proteina

Tiolizacija proteina se uspešno koristi za poboljšanje funkcionalnih osobina proteina kao što su: elastičnost, želiranje, tekstura, viskozitet i termostabilnost. Ova svojstva su u velikoj meri zavisna od sulfhidrilnih ostataka cisteina i formiranih disulfidnih mostova. Preuređenjem intra i inter disulfidnih mostova, reakcijama oksidacije ili redukcije, funkcionalne osobine mogu biti promenjene i poboljšane.

### *Umrežavanje proteina-„cross-linking“*

Jedan od značajnijih načina modifikovanja funkcionalnih osobina proteina je putem njihovog umrežavanja. Najvažniji mogući načini umrežavanja proteina preko aminokiselinskih bočnih ostataka, u toku procesuiranja hrane šematski su prikazani na Slici 7 (Gerrard, 2002).



Slika 7. Šematski prikaz reakcija umrežavanja proteina (Preuzeto od Gerrard, 2002).



Generalno, na proces umrežavanja proteina utiču procesni parametri, kao što su: zagrevanje, promena pH reakcionog medijuma ili dodatak enzima. Umrežavanjem proteina hrane dolazi do promena mnogih osobina kao što su tekstura, viskozitet, rastvorljivost, emulzione osobine, želiranje i dr. (Kuraishi i sar., 2000; Motoki i Kumazawa, 2000).

Specifični uslovi rezultuju specifičnim tipovima reakcija umrežavanja proteina. Najčešći tipovi reakcija umrežavanja proteina koje se dešavaju tokom procesuiranja hrane su: preko disulfidnih mostova, preko dehidroproteina, ostataka tirozina, preko Maillard-ove reakcije i enzimskim putem (Gerrard 2002). Od enzimskih reakcija, primena transglutaminaze je najviše ispitivana u cilju promena funkcionalnih osobina proteina, što će biti razmatrano u narednom poglavlju.

Disulfidni mostovi predstavljaju najčešći tip kovalentnog povezivanja proteina. Promene koje nastaju usled formiranja disulfidnih veza, kao rezultat zagrevanja, dokazano je da utiču na sposobnost formiranja gelova kod raznih vrsta proteina uključujući proteine mleka, soje, jaja, mesa i nekih biljnih proteina (Zayas, 1997). Takođe, formiranjem disulfidnih veza u glutenu može se uticati na viskoelastične osobine pekarskih proizvoda (Lindsay i Skerritt, 1999).

Maillard-ov tip umrežavanja proteina, takođe ima za posledicu promene funkcionalnih osobina proteina (Gerrard i sar., 2001, Hill i Easa, 1998). Tokom zagrevanja kao rezultat reakcije formira se aroma, ukus i boja u hrani, koji mogu biti korisni ili štetni, sa stanovišta kvaliteta hrane (Martins i sar., 2001). Maillard-ova reakcija odigrava se između aminokiselinskih ostataka u proteinu i karbonilne grupe, koja potiče, najčešće od šećera. Umrežavanjem proteina putem Maillard-ova reakcija formira se veliki broj produkata tokom procesuiranja hrane što je potvrđeno brojnom naučnom literaturom (Ames, 1992; Easa i sar., 1996a, 1996b; Fayle i sar., 2000, 2001; Gerrard i sar., 1998a, 1999; Hill i Easa, 1998).

Formaldehid, glutaraldehid, glioksal i gliceraldehid mogu da izazovu inter- i intramolekulsko umrežavanje proteina (Acharya i sar., 1988, Gerrard i sar., 2002, Marquie, 2001). Utvrđeno je da je  $\epsilon$ -amino grupa lizinskog ostatka primarno reaktivno mesto između proteina i aldehida. Kao rezultat, nastaju oligomeri proteina putem kovalentne agregacije (Gerrard i sar., 2003a, Gerrard i sar., 2003b). Kako su proteini soje naročito bogati lizinom, to ih čini pogodnijim supstratom za Maillard-ovu reakciju u odnosu na druge proteine (Liu, 1997; Zarkadas i sar., 1997). Od gore pomenutih aldehida, kao promotera umrežavanja, utvrđeno je da je najefikasniji glutaraldehid, zatim formaldehid pa gliceraldehid (Gerrard i sar., 2003b).

Primenom formaldehida za kovalentno umrežavanje dolazi do značajnih promena funkcionalnih osobina proteina (Singh, 1991). Na primer, proteinski film proizveden od

umreženog želatina pomoću formaldehida pokazuje povećanje čvrstoće i ima veću termalnu stabilnost kao i tačku topljenja kao rezultat visokog stepena umreženosti (de Carvalho i Grosso 2004). Pored toga, dokazano je da osim lizinskih ostataka, sa formaldehidom reaguju i cisteinske i histidinske grupe i formiraju kovalentne veze (Galiotta i sar., 1998, Marquie i sar., 1995). Proteinski filmovi soje i pšeničnog gluten, takođe, pokazuju bolje osobine čvrstine i elastičnosti usled tretmana sa formaldehidom (Ghorpade i sar. 1995; Micard i sar., 2000, Rhim i sar., 2000).

Glutaraldehyd se intenzivno koristi kao reagens za umrežavanje proteina u svrhu produkcije biopolimera (Kikuchi i sar., 2004, Ustunol i Mert, 2004). Takođe, našao je primenu i kod umrežavanja albumina i globulina pšeničnih proteina pri čemu dolazi do značajnih poboljšanja u strukturi i teksturi pekarskih proizvoda (Gerrard i sar., 2003b).

Postoje još mnogi komercijalni hemijski agensi za umrežavanje proteina (Pierce, 2001). To su uglavnom reagensi koji imaju dva aktivna mesta dobijeni iz molekula koji imaju sposobnost da reaguju sa bočnim ostacima proteina (Feeney i Whitaker, 1988; Singh, 1991). Generalno oni na specifičan način koriste ostatke lizina i/ili cisteina u proteinu. Na žalost, hemijski reagensi za umrežavanje proteina su uglavnom skupi i, u većini slučajeva, njihovo korišćenje se ne odobrava za primene u procesuiranju hrane, te stoga, njihova primena nije široko rasprostranjena (Singh, 1991).

## 2.3.2. Enzimske modifikacije proteina

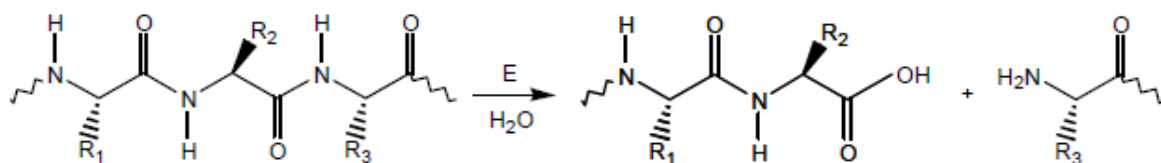
Enzimi ili enzimski izvori se tradicionalno primenjuju u procesima modifikacije hrane od davnina. Naročito zbog blagih uslova pri kojima deluju, u odnosu na one zastupljene pri hemijskim i fizičkim tretmanima, sve veći interes postoji za enzimskim metodama u funkciji modifikacije proteina hrane. Generalno, enzimske metode modifikacije proteina dele se na (i) enzimsku hidrolizu i (ii) enzimsko umrežavanje (eng „cross-linking“).

### 2.3.2.1. Enzimaska hidroliza

Kontrolisana i limitirana enzimaska hidroliza proteina pokazala se jednom od najpogodnijih metoda za modifikaciju proteina u cilju dobijanja proteinskih hidrolizata sa poboljšanim, čak i novim funkcionalnim karakteristikama u odnosu na izvorne proteine. Brojna naučna literatura potvrđuje efikasnost enzimske hidrolize za modifikaciju proteina iz različitih izvora: soje (Jung i sar., 2005; Surowka i sar., 2004a), suncokreta (Martinez i sar., 2005), uljane repice (Vioque i sar., 2000), proteina surutke (Chobert i sar., 1988), semena ovsa (Guan i sar., 2007), semena leguminoza (Dudek i sar., 1996) uljane pogače, uljane tikve (Peričin i sar., 2009; Vaštag i sar., 2010; Vaštag i sar., 2011; Živanović i sar., 2010). Enzimaska hidroliza ima niz prednosti u odnosu na hemijske i termičke hidrolitičke tretmane:

- Blagi reakcioni uslovi pri kojima se izvodi (pH 6-8 i temperatura 30–50°C);
- Nema zaostalih hemijskih reagenasa u produktima;
- Relativno laka kontrola procesa rezultuje hidrolizatima definisanih veličina (Panaym i Kilara, 1996; Clemente, 2000).

Generalno, enzimaska hidroliza proteina predstavlja degradaciju proteina na polipeptide, peptide i/ili amino kiseline dejstvom proteolitičkih enzima. Tokom procesa hidrolize raskidaju se peptidne veze i u prisustvu molekula vode oslobađaju se delovi proteina (Slika 8.) Novoformirani hidrolizati, takođe, mogu predstavljati supstrat u daljem toku reakcije hidrolize.



**Slika 8.** Proces enzimske hidrolize proteina

Tri najznačajnija faktora koja utiču na produkt hidrolize, odnosno peptidni sastav hidrolizata, su: proteinski supstrat, tip primenjene proteaze i reakcioni uslovi.

#### *Proteinski supstrat*

Aminokiselinski sastav i sekvenca, kao i trodimenzionalna struktura proteina direktno utiču na osetljivost proteinskog supstrata ka enzimu i na vrstu produkata koji se formiraju u procesu hidrolize. Globularni proteini su nepogodniji kao supstrati u procesu hidrolize zbog svoje kompaktne strukture, jer je većina peptidnih veza locirana u unutrašnjosti molekula i nepristupačna enzimu. Za globularne proteine postoji postulat Linderstrom-Lang-a da je neophodna reverzibilna denaturacija proteina radi otvaranja strukture i oslobađanja peptidnih veza na površini molekula (Adler-Nissen, 1993). Ovo se obično postiže termičkom denaturacijom (Guo i sar., 1995). Druga bitna karakteristika proteinskog supstrata je primarna struktura, odnosno raspodela hidrofilnih i hidrofobnih aminokiselinskih ostataka. Hidrolizom proteina kod kojih su hidrofilni i hidrofobni delovi nasumično raspoređeni dobijaju se peptidi sa sličnom raspodelom naelektrisanja i hidrofobnih grupa, dok molekuli u kojima postoje razdvojeni hidrofilni/ hidrofobni regioni kao rezultat hidrolize imaju peptide sa različitom raspodelom naelektrisanja i hidrofobnosti (Caessens, 1999).

#### *Proteaze*

Izbor enzima koji će biti primenjen u procesu enzimske hidrolize proteina je od velikog značaja. On direktno utiče na peptidni profil finalnog produkta hidrolize zbog razlike u enzimskoj specifičnosti. Stoga, hidrolizati dobijeni primenom različite vrste enzima se razlikuju u funkcionalnosti (Caesens i sar., 1999).

Veliki broj proteaza namenjenih za prehrambenu upotrebu, tkz. „food-grade“ proteaze su našle primenu u procesu enzimske hidrolize. Lista najčešće korišćenih proteaza u hrani

prikazana je u Tabeli 4. Proteaze mogu biti klasifikovane prema izvoru (životinjskog, biljnog porekla i mikrobne), zatim prema tipu reakcije (endo- ili egzo-tip) kao i prema prirodi katalitičkog mesta (alkalne proteaze ili serinske, tiolne ili cisteinske proteaze, metalo-proteaze i kisele proteaze) (Whitaker, 1994).

Serinske proteaze su najčešće alkalne i aktivne su u pH opsegu od 6.0 do 11.0 i u aktivnom mestu imaju serinski ostatak. Tiolne ili cisteinske proteaze u aktivnom mestu imaju cisteinski i histidinski ostatak i najveću aktivnost imaju na neutralnim pH vrednostima. Metalo proteaze za svoju aktivnost zahtevaju prisustvo bivalentnih metalnih jona, a aktivnost im može biti inhibirana u prisustvu helirajućih agenasa kao što je EDTA. Optimalnu aktivnost pokazuju na neutralnim pH vrednostima. Gotovo sve metalo proteaze su egzo tipa. Kisele proteaze ili aspartil proteaze imaju optimalnu aktivnost u kiselom opsegu pH vrednosti i u aktivnom mestu im je asparaginska kiselina.

Komercijalni enzimski preparati su najčešće mešavina različitih tipova proteaza, kao što je npr. Pankreatina, koji predstavlja mešavinu endo i egzo proteaza.

**Tabela 4.** Najčešće korišćene proteaze u procesuiranju proteina hrane

Naziv	Izvor	Priroda aktivnog mesta	Specifičnost
<i>Enzimi životinjskog porekla</i>			
Himotripsin	Goveđi, svinjski pankreas	Serinske proteaze	Phe, Tyr, Trp
Pankreatin	Goveđi, svinjski pankreas	Serinske proteaze	Široka specifičnost
Tripsin	Goveđi, svinjski pankreas	Serinske proteaze	Lys, Arg
Pepsin	Goveđi, svinjski želudac	Aspartil proteaze	Aromatične amino kis.
Himosin	Teleći abdomen	Aspartil proteaze	Phe-Met u kazeinu
<i>Enzimibiljnog porekla</i>			
Bromelin	Ananas	Cisteinske proteaze	Lys, Arg, Phe, Tyr
Ficin	Smokva	Cisteinske proteaze	Phe, Tyr
Papain	Papaja	Cisteinske proteaze	Lys, Arg, Phe
<i>Bakterijski enzimi</i>			
Subtilisin	<i>Baccillus subtilis</i>	Serinske proteaze	Široka specifičnost
Alkalaze	<i>Baccillus licheniformis</i>	Serinske proteaze	Široka specifičnost
<i>Fungalni enzimi</i>			
Renilaze	<i>Mucor miehei</i>	Aspartil proteaze	Kao sirište
Proteaze	<i>Aspergillus spp.</i>	Aspartil proteaze	Široka specifičnost

#### Reakcioni uslovi

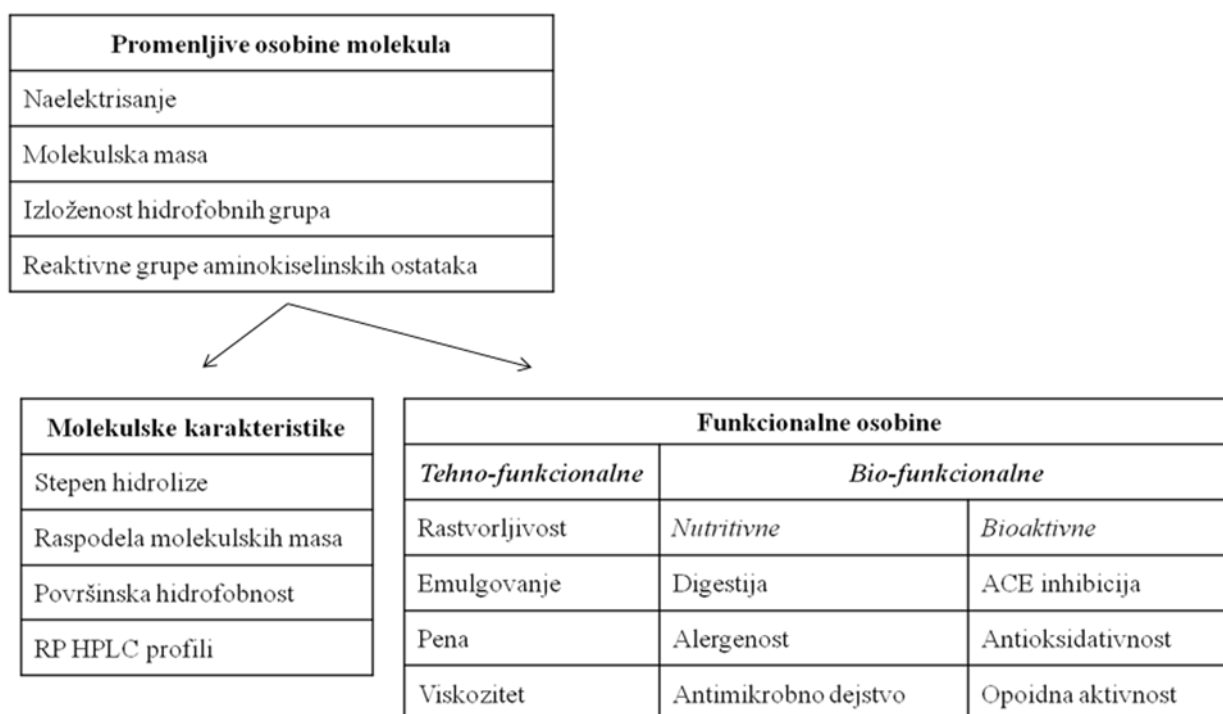
U procesima enzimske hidrolize proteina parametri koji imaju najveći uticaj na produkte hidrolize su: temperatura, pH, enzim/supstrat odnos i reakciono vreme. Prva tri

navedena parametra određuju brzinu reakcije i mogu da utiču na specifičnost enzimske smeše, dok se reakciono vreme odnosi samo na finalni stepen, odnosno dužinu hidrolize. Takođe, međusobna interakcija ovih parametara ima uticaj na sastav hidrolizata. Izbor navedenih parametara je kompleksan, jer zavisi i od rastvorljivosti proteinskog supstrata i aktivnosti enzima. Pored toga, proteaze imaju svoje optimalne i granične vrednosti temperature i pH u okviru kojih je moguće optimizirati proces hidrolize primenom statističkih metoda (Peričin i sar., 2009a).

Tokom hidrolitičkog procesa nije samo odabir procesnih parametara važan, takođe kontrola i održavanje početnih vrednosti je neophodna. pH vrednost se menja tokom procesa hidrolize (Adler-Nissen, 1982). Pri niskim vrednostima pH, sve amino grupe su protonovane, a karboksilne primaju protone što rezultuje porastom pH reakcione smeše i neophodno je dodavanje kiseline za održavanje pH. U neutralnoj ili alkalnoj oblasti sve karboksilne grupe su disosovane, a deo amino grupa podleže disocijaciji pa pH reakcione smeše zbog toga opada i neophodno je neutralisati dodatkom baze. Enzimaska hidroliza proteina se, iz tog razloga, izvodi u puferovanim rastvorima ili u pH-stat sistemu. U pH-stat sistemu pH se reguliše postepenim dodavanjem rastvora kiseline ili baze (HCl ili NaOH) (Adler-Nissen, 1986).

#### *Karakterizacija proteinskih hidrolizata*

Tokom procesa enzimske hidrolize dešavaju se tri najvažnije promene koje imaju značajan uticaj na funkcionalne osobine molekula: (i) dolazi do povećanja broja jonizujućih grupa (amino i karboksilnih), što za posledicu ima povećanje hidrofилnosti i površinskog naelektrisanja proteina; (ii) dolazi do smanjenja molekulske mase; (iii) i dolazi do promena molekulske strukture čime se na površini otkrivaju hidrofobne grupe koje su bile zarobljene u unutrašnjosti molekula (Caessens i sar., 1999). Ove molekulske promene se mogu detektovati primenom nekoliko analitičkih metoda koje odražavaju jednu ili više molekulskih osobina. Kao rezultat promene molekulskih osobina dolazi do promena funkcionalnih osobina koje podrazumevaju osim tehno-funkcionalnih i biološke i nutritivne osobine (Slika 9) (van der Ven, 2002).



**Slika 9.** Promene karakteristika proteina tokom procesa hidrolize (preuzeto od van der Ven, 2002)

Najčešće korišćena veličina kojom se opisuje proces i produkti hidrolize je stepen hidrolize (eng. Degree of Hydrolysis) DH. Drugi značajan parametar je raspodela molekulskih masa (eng. Molecular weight distribution) peptida u hidrolizatu. Ova veličina se uglavnom određuje primenom metode SDS gel elektroforeze (Galvao et al., 2001) ili gel hromatografijom (eng. Size Exclusion Chromatography). Primenom ove hromatografske tehnike molekuli se razdvajaju po principu razlike u hidrodinamičkom volumenu, koji zavisi od veličine i konformacije molekula. Takođe, karakterizacija hidrolizata može se izvesti primenom hromatografske tehnike na reversnim fazama. Razlika u hidrofobnosti aminokiselinskih ostataka je faktor koji je presudan za proces razdvajanja primenom ove hromatografske tehnike.

Enzimski modifikovani proteini našli su primenu u širokom dijapazonu proizvoda kako u prehrambenoj tako i u drugim industrijama u zavisnosti od nutritivnih i funkcionalnih osobina. Veći peptidi (2–5 kDa) se uglavnom koriste kao funkcionalni ingredijenti i u proizvodima za ličnu higijenu. Peptidi srednjih veličina (1–2 kDa) koriste se u svrhe kliničke ishrane i u proizvodima namenjenim sportistima (Frokjaer, 1994; Schmidl i sar., 1994; Siemensma i

Kunst, 1999). Manji peptidi (< 1 kDa) primenjuju se u proizvodima za odojčad i u niskoalergenim proizvodima (Siemensma i sar., 1993).

### **Stepen hidrolize**

Kao što je već rečeno, najčešće korišćena veličina kojom se opisuju proces i produkti hidrolize je stepen hidrolize. Stepem hidrolize predstavlja udeo hidrolizovanih peptidnih veza u molekulu proteina i izračunava se primenom sledeće jednačine (6):

$$DH = h/h_{tot} \times 100\% \quad (6)$$

Gde je h broj broj hidrolizovanih peptidnih veza, a  $h_{tot}$  ukupan broj peptidnih veza prisutnih u proteinskom molekulu. Izračunavanje vrednosti za  $h_{tot}$  izvodi se iz amino kiselinskog sastava proteina (Adler-Nissen, 1986). Postoji više metoda kojima se može meriti vrednost DH. Sve metode se generalno zasnivaju na tri principa: (i) određivanje rastvorljivih proteina (azota) nakon dodatka trihlorsirćetne kiseline (TCA) kao precipitirajućeg agensa; (ii) određivanje slobodnih amino grupa koje nastaju tokom procesa hidrolize i (iii) titracija oslobođenih karboksilnih grupa. U cilju određivanja koncentracije proteina najčešće se koristi Kjeldahl-ova metoda (AOAC, 1995), zatim spektrofotometrijsko određivanje u UV-oblasti, u slučaju peptida sa aromatičnim amino kiselinama ili u vidljivoj oblasti nekom od kolorimetrijskih metoda npr. Biuret ili Lowry metod (Hung i sar, 1984). Određivanje slobodnih amino kiselina može se izvesti u prisustvu različitih hemijskih reagenasa: kao što su ninhidrin (Turgeon i sar.,1991), 2,4,6-trinitrobenzen sulfonska kiselina (TNBS) (Weiglele i sar., 1972) i ortoftaldialdehid (OPA) (Touati i sar., 1992). Titracija novoformiranih karboksilnih grupa tokom procesa hidrolize poznata je kao pH-stat tehnika (Aldler-Nissen, 1979) i ona se najčešće primenjuje u cilju određivanja DH vrednosti.

Evidentno je da ne postoji jedinstvena tehnika za određivanje vrednosti DH čime se stvaraju problemi pri komparaciji rezultata hidrolize različitih istraživača. Stoga, funkcionalna ili druga (biološka, nutritivna) svojstva hidrolizata u korelaciju sa DH, mogu biti upoređena sa svojstvima hidrolizata drugog proteinskog izvora sa istim DH, samo ako se strogo vodi računa kojim metodama je utvrđen DH (Vaštag, 2011).

### *Nutritivne osobine hidrolizata*

Najznačajnije promene u pogledu nutritivnih osobina tokom procesa enzimske hidrolize se odražavaju na povećanje digestije odnosno svarljivosti hidrolizata u odnosu na protein. Ova



osobina je od velikog značaja za proteinske hidrolizate koji su našli primenu u formulacijama hrane namenjenim osobama sa poremećajima digestivnog trakta. Nutritivna vrednost prvenstveno je determinisana količinom esencijanih amino kiselina u hidrolizatu i zavisi od amino kiselinskog sastava proteina. U određenim slučajevima primene hidrolizata zahtevan je specifičan amino kiselinski sastav, na primer u proizvodima namenjenim za osobe koje boluju od fenilketonurije, kad ne sme biti prisutan fenilalanin (Lopez-Bajonero i sar., 1991). Takođe, prednost hidrolizata u odnosu na protein je ta što su termički stabilniji te su pogodniji za pasterizovane proizvode (Kunst, 2003).

Druga značajna nutritivna osobina proteina na koju utiče proces hidrolize je alergenost. Procesom enzimske hidrolize dolazi do smanjenja alergenosti hidrolizata u odnosu na početni protein, jer dolazi do uništavanja proteinskih epitopa koji su odgovorni za alergijsku reakciju (Mahmoud i sar., 1992). Za primenu u hipoalergenim proizvodima proteini su visokohidrolizovani, što rezultira produktom koji sadrži peptide malih molekulskih masa. Ne postoji tačno definisana veličina molekula ispod koje su peptidi nealergeni ili iznad koje su alergeni. Generalno, smatra se da je limit za alergenost peptid koji se sastoji od 10-15 amino kiselina (Bindels, 1992).

#### *Biološke osobine hidrolizata*

Pored nutritivnih osobina, proteini i peptidi mogu posedovati i specifične fiziološke osobine. Fiziološke osobine peptida obuhvataju regulaciju povišenog krvnog pritiska, snižavanje holesterola i triglicerida u plazmi, antioksidantnu aktivnost, pospešivanje transporta i apsorpcije minerala, opioidne aktivnosti, antimikrobno delovanje i antikancerogeno delovanje (Pihlanto, 2001; Korhonen i Pihlanto, 2006).

Procesom enzimske hidrolize izdvajaju se biološki aktivni peptidi. Pod biološki aktivnim peptidima podrazumevaju se peptidi koji poseduju jednu ili više specifičnih bioloških aktivnosti koje imaju pozitivne efekte na fiziološke procese i stanje organizma (Korhonen, 2009). Najviše istraženi izvori biološki aktivnih peptida u hrani su proteini mleka i soje (Korhonen, 2009). Takođe, biološki aktivni peptidi mogu se dokazati i izolovati iz drugih životinjskih i biljnih proteinskih izvora: krvi (Daoud i sar., 2005), mesa (Arihara, 2006), ribe (Salampessy i sar., 2010), jaja (Mine i sar., 2004) i semena leguminoza, uljarica i žitarica (Zhu i sar., 2006; Cumby i sar., 2008; Torruco-Uco i sar., 2009; Vaštag i sar., 2011).

### **Peptidi sa ACE inhibitornim osobinama**

Među biološki aktivnim peptidima, peptidi sa ACE inhibitornim osobinama izazivaju veliku pažnju i predmet su izučavanja brojnih studija zbog njihove primene u lečenju hipertenzije. Angitenzin konvertujući enzim (ACE) (dipeptidil karboksipeptidaza, EC 3.4.15.1) igra veoma važnu ulogu u regulaciji krvnog pritiska. ACE enzim konvertuje neaktivni dekaeptid angitenzin I u aktivni oktapeptid angitenzin II koji povećava krvni pritisak i takođe inaktivira vazodilatator bradikinin (Erdos, 1975). Sintetički ACE inhibitori uglavnom izazivaju prateće nus pojave, zbog toga je izučavanje prirodnih ACE inhibitora postao atraktivan pravac u naučnoj literaturi. Mnogi ACE inhibitorni peptidi dobijeni su procesom enzimske hidrolize različitih proteina hrane kao što su: kazein (Pihlanto, 2006;), proteini surutke (Pihlanto-Leppala, 2001), proteini ribe (Wako i sar., 1996), proteini soje (Wu i Ding, 2001), uljane tikve (Vaštag i sar., 2011) i glutena (Suh i sar., 2003).

### **Antioksidantna aktivnost.**

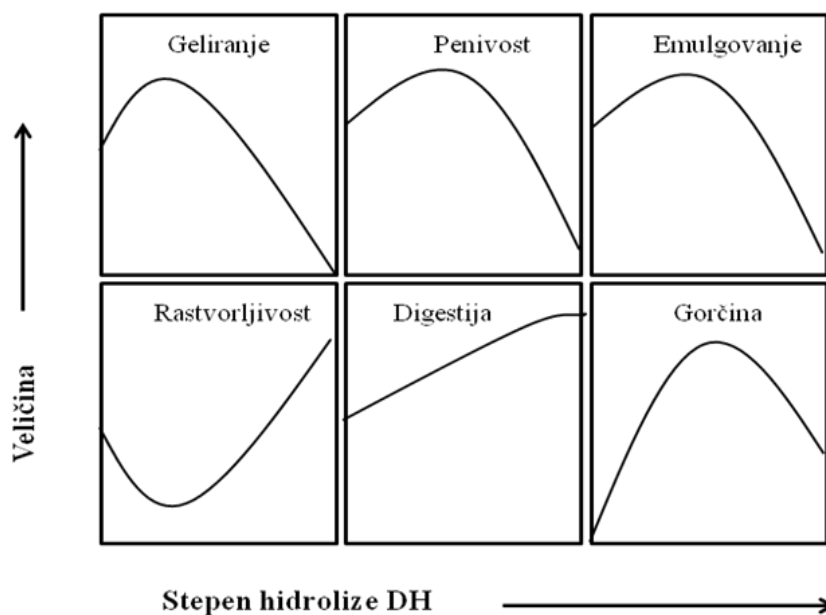
Postoji sve veće interesovanje u naučnoj literaturi za antioksidantima iz prirodnih izvora koji nemaju potencijalnu opasnost za zdravlje kao oni sintetičke prirode. Proteinski hidrolizati iz biljnih i životinjskih izvora kao što su surutka (Pihlanto-Leppala, 2001), soja (Moure i sar., 2006b), riba (Klompong i sar., 2007; You i sar., 2009), uljarica (Cumby i sar., 2008; Yoshie-Stark i sar., 2008) i dr., pokazali su se kao snažni antioksidativni agensi.

Mehanizam delovanja ovih proteinskih antioksidanasa je različit: deluju kao hvatači slobodnih radikala, učestvuju u jedno-elektronskim redoks reakcijama čime sprečavaju formiranje slobodnih radikala, učestvuju u oksido-redukcionim reakcijama sa metalnim jonima ili heliraju metalne jone, a mogu biti zaštitni agensi u peroksidaciji lipida, sprečavajući oksidaciju lipida formiranjem membrane oko uljanih kapljica (Moure i sar., 2006b). Antioksidantna aktivnost proteinskih hidrolizata zavisi od aminokiselinskog sastava i sekvence. U hidrolizatima, na aminokiselinski sastav utiču specifičnosti proteaze. Izborom enzima, variranjem odnosa protein-enzim, vremena i stepena hidrolize, mogu se proizvesti različiti niskomolekularni peptidni antioksidanti. Ovo je dokazano na proteinskom izolatu pogače uljane tikve, gde se vidi koliko veličina DH i vrsta proteaze značajno utiče na biološke osobine dobijenih peptida (Vaštag i sar., 2011).

### 2.3.2.1.1. Funkcionalne osobina proteinskih hidrolizata

Brojna naučna literatura potvrđuje pozitivan uticaj enzimske hidrolize na funkcionalne osobine proteina kao što su: rastvorljivost, adsorpcija vode i ulja, emulzione osobine, formiranje pene, viskozitet itd (Haard, 2001; Pizones i sar., 2007; Kristinsson i Rasco, 2000; Chabanon i sar., 2007) Zbog toga, proteinski hidrolizati su našli primenu u velikom broju konvencionalnih i inovativnih prehrambenih proizvoda, kozmetičkih preparata, medikamenata ili se koriste u okviru specijalnih režima ishrane (Govindaraju i Srinivas, 2006; Kunst, 2003).

Parametar kojim se najčešće definiše hidrolizat i njegove osobine, kao što je već napred rečeno je DH. Na Slici 10 prikazan je uticaj enzimske hidrolize, kao funkcija DH na veličine kojima se karakteriše funkcionalnost proteina.



**Slika 10.** Efekti enzimske hidrolize na funkcionalnost proteina (Preuzeto od de Roos, 2009)

#### *Rastvorljivost*

Najveće promene u pogledu funkcionalnosti proteina, usled dejstva enzimske hidrolize dešavaju se u pogledu povećanja rastvorljivosti. Kao preduslov za primenu u određenim formulacijama hrane i drugim proizvodima, hidrolizati moraju pokazati dobru rastvorljivost pri definisanim uslovima. Rastvorljivost proteinskih hidrolizata u širokom opsegu vrednosti pH, temperature i jonske jačine jedan je od najznačajnijih fizičko-hemijskih i funkcionalnih

osobina hidrolizovanih proteina. Brojna naučna literatura dokazuje povećanje rastvorljivosti različitih protein procesom enzimske hidrolize (Zayas, 1997; Mahmoud, 1994; Kunst, 2003)

Proteini, generalno imaju najmanju rastvorljivost u neutralnoj i slabo kiseloj sredini, što je ujedno opseg pH vrednosti većine prehrambenih proizvoda. Proces enzimske hidrolize dovodi do značajnog povećanja rastvorljivosti proteina pri pH vrednostima bliskim izoelektričnoj tački (blago kisela ili neutralna oblast pH vrednosti), što je posledica smanjenja molekulske mase i hidrofobnog karaktera molekula, kao i povećanja broja polarnih jonizujućih grupa na površini molekula (Chobert i sar., 1988). Uticaj hidrolize na rastvorljivost proteina na ostalim vrednostima pH uveliko zavisi od vrste proteina i primenjenog enzima. Stepem hidrolize je, takođe, parametar koji ima uticaj na rastvorljivost. Generalno, rastvorljivost hidrolizata linearno raste sa porastom vrednosti DH (Panyam i Kilara, 1996).

Hidrolizom izolata soje, koji je u osnovi globulinski, primenom tripsin i alkalaze dobijaju se hidrolizati sa većom rastvorljivošću u odnosu na hidrolizate izolata soje dobijene dejstvom himotripsina (Kim i sar., 1990). Zbog male rastvorljivosti u kiseloj oblasti pH, kazein i kazeinati su imali ograničenu primenu u kiselim prehrambenim proizvodima i piću. Međutim, hidrolizom kazeina primenom tripsina rastvorljivost je značajno povećana u opsegu pH od 1-5. Značajno povećanje rastvorljivosti globulina u oblasti pH bliskih izoelektričnoj tački primenom procesa enzimske hidrolize dokazali su Guan i saradnici (2007). Oni su hidrolizovali globulinsku frakciju ovasa primenom tripsina. Takođe, Govindarju i saradnici (2006) povećali su rastvorljivost arašina dejstvom alkalaze i papaina.

### *Emulzione osobine*

Emulzione osobine predstavljaju važnu karakteristiku proteinskih hidrolizata zbog sve veće važnosti u primeni hidrolizata u raznim formulacijama hrane kao emulgujućih agenasa. Emulzije su sastavni deo većine gotovih proizvoda, stoga postoji sve veći naučni interes ka iznalaženju novih emulgujućih agenasa. Emulzione osobine proteinskih hidrolizata su blisko vezane sa njihovom rastvorljivošću, hidrofobnosti i veličinom molekula. Emulziona svojstva značajno se menjaju u zavisnosti od vrste enzima i vrednosti stepena hidrolize. Generalno, poboljšanje emulzionih osobina proteina postiže se procesom limitirane hidrolize (niže vrednosti DH), dok produženjem procesa hidrolize dolazi do smanjenja vrednosti ovih osobina proteina (Kristinsson i Rasco, 2000; Chabanon i sar., 2007).

Emulziona osobine poseduju enzimski hidrolizati dobijeni iz kazeina (Tunctork i Zorba, 2006), proteina ribe (Slizyte i sar., 2005), globulina uljane repice (Chabanon i sar., 2007), glicinina (Tsumura i sar., 2005), globulina semena kikirikija (Jamdar i sar., 2010), proteinskih izolata semena raznih leguminoza (Arcan i Yemenicioglu, 2010) i drugih. Hidrolizati poboljšanih emulzionih osobina dobijeni su primenom različitih proteaza: tripsin (Kong, 2007), pepsin (Tsumura i sar., 2005; Arcan i Yemenicioglu, 2010), pankreatin, (Kong, 2007), flavorzim (Slizyte i sar., 2005), neutraze, (Tunctork i Zorba, 2006), alkalaze (Chabanon i sar., 2007; Jamdar i sar., 2010).

Poređenjem sa proteinskim izolatom kikirikija, njegov hidrolizat sa vrednošću DH 10% pokazuje višu vrednost emulzionog kapaciteta na pH 6, dok je na pH 3 emulziona aktivnost niža. Na neutralnoj pH vrednosti, povećanje DH dovodi do smanjenja emulziona aktivnosti proteinskih hidrolizata kikirikija, navode autori. U alkalnoj sredini, emulziona aktivnost je nezavisna od vrednosti DH hidrolizata (Jamdar i sar., 2010). Kong (2007) je izučavajući emulziona osobine glutena i njegovih hidrolizata, dokazao da hidrolizat relativno niske vrednosti DH od 5% ima značajno bolje emulziona osobine od glutena. Enzimskom hidrolizom kazeina primenom neutralne proteaze, Tunctork i Zorba (2006) su pokazali da se poboljšane osobine emulzija (kapacitet i stabilnost) dobijaju nakon 5 minuta trajanja procesa hidrolize i ne menjaju se sledećih 20 minuta reakcije. Nakon tog perioda njihova vrednost značajno se smanjuje u poređenju sa originalnim proteinom. Hidrolizovanjem globulina uljane repice do vrednosti DH od 5% dolazi do značajnog unapređenja emulzionih osobina, dok pri vrednostima DH većim od 15% ove osobine se smanjuju (Chabanon i sar., 2007). Ovo se poklapa sa tvrdnjama Chobert i saradnici (1988) koji kaže da produženje procesa hidrolize (povećanje vrednosti DH) dovodi do smanjenja vrednosti EA. Sličan trend su zapazili i Kristinsson i Rasco (2000), kod proteinskih hidrolizata proteina ribe. Hidrolizati većih vrednosti DH imaju smanjene vrednosti EA i ES zbog prisustva peptida manjih veličina. Mali peptidi migriraju brže i adsorbuju se na graničnoj površini faza, ali imaju manju efikasnost u redukciji međufaznog napona jer ne mogu da se odmotaju i reorjentišu na površini, kao veliki peptidi, radi stabilizovanja emulzije (Gbogouri i sar., 2004; Rahali i sar., 2000).

#### *Sposobnost formiranja pene*

Proces enzimske hidrolize proteina u naučnoj literaturi je predstavljen kao jedna od mogućnosti unapređenja sposobnosti formiranja pene. Poređenjem sa proteinima, peptidi difunduju mnogo brže na površinu, međutim, određena molekulska težina je potrebna da bi

neki peptid posedovao površinske osobine i stabilizovao penu (Larre i sar., 2006). Ograničenom, limitiranom hidrolizom produkuj se peptidi poboljšanih osobina penušavosti. Hidrolizovanjem proteina surutke primenom alkalaze, Althouse i saradnici (1995) su pokazali da nakon ultrafiltracije, kapacitet i stabilnost pene permeata su reda veličine osobina pene belanceta jajeta. Ovi rezultati ukazuju da veći peptidi i nehidrolizovani proteini mogu imati inhibirajući efekat na osobine pene ili zbog hidrofobnih interakcija ili steričnih smetnji. U slučaju hidrolize kazeina kiselom fungaln timerazom, hidrolizat sa vrednošću DH 5% pokazuje značajno unapređene osobine pene (Panyam i Kilara, 1996). Van der Ven (2002) je dokazao da raspodela molekularnih masa hidrolizata proteina surutke je u korelaciji sa sposobnošću formiranja pene. Hidrolizom laktoglobulina povećava se kapacitet pene i takođe raste afinitet prema međupovršini (Rahali i sar., 2000). Osobine pene pšeničnog glutena, znatno su unapređene procesom hidrolize (Linares i sar., 2000). Do određenog, optimalnog stepena hidrolize svi hidrolizati imaju unapređene osobine pene u odnosu na gluten, ali daljim procesom hidrolize opadaju vrednosti stabilnosti pene. Još nekoliko autora u svojim istraživanjima pokazuju da ograničena hidroliza može da poboljša sposobnost formiranja pene ali da smanjuje stabilnost (Chobert i sar., 1988; Vioque i sar., 2000). Međusobno poređenje karakteristika pene proteinskih hidrolizata, reportovanih u literaturi, je teško, jer osobine pene značajno zavise od korišćenih metoda kako u procesu pripreme pene tako i u merenju formiranja i stabilnosti pene (Wildw i Clark, 1996). Osim toga, osobine pene zavise od osobina rastvarača, kao što je pH i jonska jačina, koje su takođe promenljive u različitim istraživanjima nađenim u literaturi.

#### *Adsorpcija ulja i vode*

Adsorpcija ulja i vode su pojave koje su direktno vezane sa fizičkim svojstvima proteina. Kako su proteinski hidrolizati uglavnom rastvorljivi u vodi, njihova sposobnost adsorpcije ulja i vode je ograničena. Miller i Groninger (1976) su pokazali da acilacijom miofibrilarnih proteina dolazi do povećanja sposobnosti vezivanja vode, dok hidroliza bromelainom snižava ove sposobnosti proteina. Nasuprot tome, hidrolizom kazeina primenom bromelaina dolazi do povećanja sposobnosti vezivanja vode (Kneifel i Seiler, 1993). Vrsta enzima i za ovu funkcionalnu osobinu ima važnu ulogu. Hidroliza proteina mleka primenom alkalaze i neutraze rezultuje hidrolizatima sa relativno niskom sposobnošću vezivanja vode (Aguilera, 1995). Riblji proteinski hidrolizati imaju bolju sposobnost adsorpcije ulja od albumina jajeta ili proteinskog izolata soje (Ahmad i Hall, 1989). Dok adsorpcija vode proteinskih hidrolizata

je bolja od albumina iz jajeta ali manja u odnosu na sojin protein. Umerena sposobnost adsorpcije ulja i vode se postiže enzimskom hidrolizom nekih ribljih proteina u prisustvu alkalaze (Shahidi, 1995).

### 2.3.2.2. Enzimsko umrežavanje proteina

Postoje brojni enzimi koji katalizuju različite reakcije umrežavanja proteina. U prehrambenoj industriji najčešće korišćene su transglutaminaze, peroksidaze i glukoza i heksoza oksidaze. Transglutaminaze su našle široku primenu u industriji mesa i mleka (Nielsen, 1995; Jaros i sar., 2006). Peroksidaze i glukozooksidaze su eksploatisane u pekarstvu (van Oort, 1996). Od skora u prehrambenoj industriji sve veći značaj se pridaje mogućnosti primene tirozinaza (Halaouli i sar., 2005), lakaza (Yamaguchi, 2000) i sulfhidril oksidaza (Thorpe i sar., 2002) u pekarstvu i industriji mleka, kao i za smanjenje alergenosti proteina (Faccio, 2011).

#### 2.3.2.2.1. Transglutaminaze (TG)

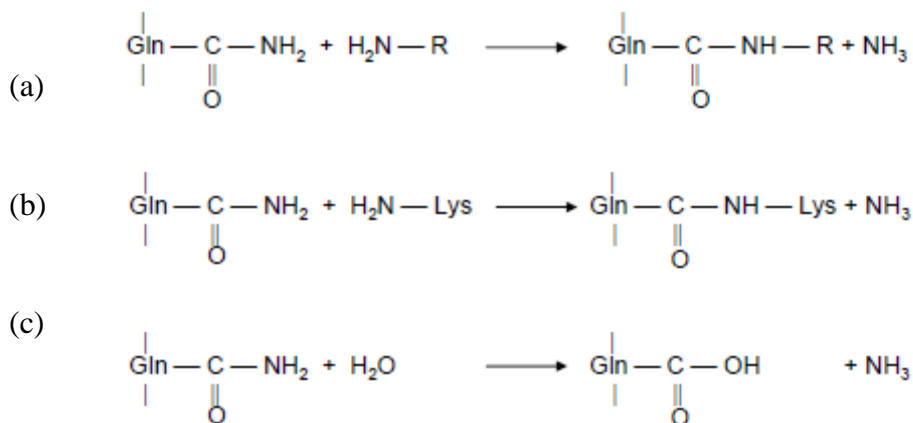
Transglutaminaze (EC 2.3.2.13,  $\gamma$ -glutamil-peptid, amin- $\gamma$ -glutamil transferaze) pripadaju grupi aciltransferaza i katalizuju reakciju prenosa acil grupe između  $\gamma$ -karboksiamidnih grupa iz proteinski vezanog glutaminskog ostatka (acil donori) i različitih primarnih amina (acil akseptori). Acil akseptori su najčešće  $\epsilon$ -amino grupe lizinskog ostatka u proteinu ili peptidu. Kao rezultat reakcije dolazi do inter- ili intramolekulskog umrežavanja kovalentnim vezama. U odsustvu amino supstrata, TG katalizuju reakciju deamidacije glutaminskog ostatka tokom koje ulogu acil akceptora ima voda. Prema tome, TG mogu modifikovati protein na tri načina: inkorporacijom amina, umrežavanjem i deamidacijom. Na Slici 11 prikazane su sve tri reakcije koje katalizuje TG (Yokoyama i sar., 2004).

Od ove tri reakcije, hidrolitička deamidacija je najsporija, zatim reakcija inkorporacije amina, dok je reakcija umrežavanja najbrža reakcija. Reakcija umrežavanja, jedina od ove tri reakcije je od interesa u procesu unapređenja funkcionalnih osobina proteina, dok reakcija između  $\gamma$ -karboksiamidne grupe i primarnih amina predstavlja pogodnu tehniku za unapređenje nutritivne vrednosti biljnih proteina ugradnjom deficitnih amino kiselina

Prva TG, citoplazmatska TG2, identifikovana je u jetri gvinejskih svinja, pre više od 50 godina (Sarkar i sar., 1957). Od tada TG je identifikovana u mnogim tkivima sisara i telesnim tečnostima (Ha i Iuchi, 2003), ribi (An i sar., 2005), biljnim izvorima (Icekson i Apelbaum, 1987). Šira biotehnoška primena i eksploatisanje TG u industriji je započeta izolovanjem TG iz bakterija *Streptomyces mobaraense* (Ando i sar., 1989), *S.ladakanum* (Tsai i sar.,



1996), *S. cinnamoneum* (Duran i sar., 1998), i *Bacillus subtilis* (Kobayashi i sar., 1998; Suzuki i sar., 2000).



**Slika 11.** Reakcije koje katalizuje transglutaminaza: (a) reakcija prenosa acil grupe; (b) reakcija umrežvanja između glutaminskog i lizinskog ostatka proteina ili peptida; (c) reakcija deamidacije (Preuzeto od Yokoyama i sar., 2004).

Osobine enzima, kao što su molekulska težina, sekvenca aminokiselina, predviđena sekundarna struktura i samo dejstvo enzima se razlikuju u zavisnosti od izvora enzima (Ando i sar., 1989; Seguro i sar., 1996). TG poreklom iz krvi sisara, tkz. koagulacioni faktor XIII je tetramer, koji sadrži dve katalitičke podjedinice (75 kDa) i dve nekatalitičke (80 kDa) (Ichinose i sar., 1990; Serafini-Fracassini i sar., 1995). Humana citoplazmatska TG 2 je dimer od 76 kDa (Fesus i Piacentini, 2002). Mikrobna TG poreklom iz *S. mobaraensis* je monomer molekulske mase 38 kDa (Ando i sar., 1989), dok TG iz *S.ladakanum* ima molekulsku masu od 30.5 kDa (Tsai i sar., 1996). Izoelektrična tačka im je na pH 8.9. Nasuprot TG iz sisara, mikrobne TG za svoju aktivnost ne zahtevaju prisustvo  $\text{Ca}^{2+}$  kao kofaktora. Enzim pokazuje svoj optimum aktivnosti na pH vrednosti od 5.0 do 8.0, mada i na pH= 4.0 i 9.0 enzim zadržava oko 30% svoje aktivnosti. One se stoga smatraju stabilnim u širokom pH opsegu. Optimalna temperatura za enzimsku aktivnost je 50°C. Zagrevanjem na 70°C gube aktivnost već u roku od par minuta.

## **Proces umrežavanja proteina**

### ***Neograničeno umrežavanje jedne vrste proteina***

Umrežavanje proteina dovodi do stvaranja dimera, trimera i velikih proteinskih polimera. U odsustvu smetnji, reakcije umrežavanja će se odvijati dok god ima glutamina i lizina dostupnih enzimu. U slučaju kada se reakcija izvodi na temperaturama na kojima je TG stabilna tokom dužeg perioda, stvaranje polimera proteina će na kraju ograničiti dostupnost amino kiselina i pokretnost TG. Formiranje gela je jedan od efekata umrežavanja proteina sa TG. Želiranje proteina je opisano za  $\alpha$ -kazein, žumance jajeta, belance, proteinski izolat soje, kazeinate i želatin (Nio i sar., 1996, Sakmoto i sar., 1994). Zbog toga što je izopeptidna veza stabilna na visokim temperaturama, proces želiranja je ireverzibilan. Stoga TG indukovani gelovi nisu alternativa želatinu koji je korišćen u mnogobrojnim prehrambenim proizvodima zbog svojih reverzibilnih osobina želiranja. Takođe, funkcionalnost želatina može biti modifikovana različitim načinima uz korišćenje TG. Bishop i Lasser (1997) su zaključili da se umrežavanjem želatina može dobiti gel koji se ne topi ni na 100°C. Međutim, umrežavanje može biti izvedeno i ispod tačke topljenja želatina kada se formira hladan gel.

### ***Delimično (ograničeno) umrežavanje jedne vrste proteina***

Kada su TG primenjene za promenu, ne samo želiranja i povećanja viskoziteta, nego i drugih funkcionalnih osobina proteina, primenjuje se delimično, odnosno ograničeno umrežavanje. Šta više, prilikom modifikacije proteinskih sastojaka, formiranje polimernih gelova velikih molekularskih masa može onemogućiti sušenje modifikovanog proteina u suvi proteinski prah (Nonaka i sar., 1994). Dodatno, otežano je i rastvaranje tako dobijenog proteinskog praha. Da bi se ustanovio optimalan stepen umrežavanja proteina, moraju se pripremiti uzorci različitog stepena umreženosti i testirati na željene funkcionalne osobine. U literaturi je često zastupljen ograničen način umrežavanja proteina radi modifikovanja funkcionalnih osobina. Delimično umreženi proteinski izolat i koncentrat soje pokazuju povećanje čvrstine gelova, dok koncentracije TG, rezultuju u povećanju stepena umreženosti, a smanjenju čvrstine gela (Nonaka i sar., 1994).

### ***Formiranje heteropolimera***

Reakcije umrežavanja proteina primenom TG mogu se primeniti i na povezivanje glutamina i lizina dva različita tipa proteina dajući heteropolimere koji imaju potpuno nove funkcionalne

osobine. Pošto TG uglavnom preferira jedan od dva proteina, stvaranje heteropolimera je otežano. Zbog toga će se prvo formirati polimeri jednog tipa proteina (Han i Damodaran 1996). Drugi protein će biti umrežen u kasnijem stadijumu, ili za protein svog tipa ili sa polimerom velike molekulske mase prvog proteina. Stoga je teško obezbediti spajanje dva različita proteina, a da se ne stvaraju veliki polimeri odvojenih proteina. Najdirektniji način da se obezbedi stvaranje heteropolimera, tokom TG katalizovanog umrežavanja dva proteina, je korišćenje jednog proteina koji nema lizine dostupne enzimu i jednog koji nema izložene glutamine. Ova metoda predstavlja pogodnu tehniku za unapređenje nutritivne vrednosti proteina, čime se deficit određenih amino kiselina nadomesti kombinovanjem proteina iz različitih izvora. Takođe, kombinacijom različitih proteina može doći do unapređenja funkcionalnih osobina. Na primer, spajanjem kazeina iz mleka ili globulina soje sa ovomucinom, glikoproteinom belanceta, unapređene su emulziona osobine u odnosu na startni protein u oba slučaja (Kato i sar., 1991). Kazein-želatin polimer nastao dejstvom mikrobne TG odlikuje se velikom rastvorljivošću na kiselim pH vrednostima (Neilsen, 1995).

### **Metode za praćenje toka reakcija transglutaminaze**

Intermolekularno umrežavanje molekula proteina pomoću TG može biti praćen sa SDS-poliakrilamid gel elektroforezom ili gel hromatografijom (eng. "size exclusion chromatography"). Proteini formiraju polimere uz povećanje u veličini molekula, i na taj način se izdvajaju prema njihovim molekulskim težinama. Intramolekularno umrežavanje je mnogo teže posmatrati, ipak, promene u hidrodinamičkoj veličini koja je rezultat intramolekularnog umrežavanja može biti vizualizovana SDS- gel elektroforezom.

U slučaju kvantitativnog definisanja procesa umrežavanja, korisna je primena metode za praćenje nastajanja amonijaka (DeBacker-Royer i sar., 1992). Ovom metodom može da se prati tok TG reakcija u dužem vremenskom periodu nego primenom SDS-gel elektroforeze, jer nema ograničenja kao što je nemogućnost ulaska polimera u gel. Nedostatak ovog merenja je to da ova metoda ne može da ukaže na razliku između tri reakcije koje katališe TG: umrežavanje proteina, acil transfer i deamidacija. Takođe, u procesu sa visokom koncentracijom proteinskog supstrata, umrežavanjem molekula proteina može doći do povećanja viskoziteta ili čak želiranja, što sprečava mogućnost merenja amonijaka (DeBacker-Royer i sar., 1992).

## Kontrola reakcija katalizovanih transglutaminazama

Regulacija stepena umrežavanja proteina je veoma bitna kada se traže optimalne funkcionalne osobine proteina. Postoji nekoliko načina za zaustavljanje reakcije umrežavanja:

*Termalna inaktivacija* TG je jednostavan način za zaustavljanje reakcije umrežavanja. Međutim, ovaj postupak nije uvek primenljiv zbog toga što visoke temperature mogu uticati na strukturu i osobine polimerizovanog proteina, kao što su agregacija i koagulisanje.

*Promena pH* vrednosti je drugi tip inaktivacije TG. Međutim, i ovaj postupak može izazvati modifikaciju proteina i precipitaciju.

*Korišćenje inhibitora koji će blokirati aktivnost TG* je najprikladnija metoda i ne uzrokuje fizičke i hemijske izmena umreženog proteina. Danas se zna za samo nekoliko sintetičkih (toksičnih) inhibitora TG: N-etilmalimid, jodoacetamid i para-živa benzoeva kiselina. Inhibicija produktom, dodavanjem amonijaka nije pogodna zato što samo usporava brzinu reakcije bez inaktivacije enzima.

*Uvođenje reakcije acil transfera* kao konkurentne reakciji umrežavanja predstavlja, takođe, alternativni način regulacije broja formiranih veza u proteinu (Jong i Koppelman, 2002).

*Primena imobilizacije TG* predstavlja sofisticiraniji način regulacije aktivnosti ovog enzima (Oh i sar., 1993). Međutim, ovaj metod može biti korišćen samo za modifikaciju proteina u rastvoru. Uopšteno, imobilizacija TG može prouzrokovati promene njenih kinetičkih osobina i interakciju sa brojnim supstratima.

### 2.3.2.2.2. Funkcionalne osobine umreženih proteina

Cilj ispitivanja TG je njena što bolja primena u prehrambenoj industriji, međutim u poslednje vreme ovaj enzim nalazi primenu i u mnogim neprehrambenim proizvodima (farmaceutskoj, kožnoj i tekstilnoj industriji). Brojna naučna literatura dokazuje široku primenu TG za umrežavanje: miofibrilarnih proteina (Kahn i Cohen, 1981), želatina (Broderick i sar., 2004), proteina mleka (Jaros i sar., 2006), soje (Nio i sar., 1996; Babiker, 2000), jaja (Sakamoto i sar., 1994), ribe (Joseph i sar., 1994) i žitarica (Larré i sar., 2000).

Modifikacija proteina se ispoljava u poboljšanju reoloških osobina, enkapsulaciji lipida, unapređenju formiranja gelova i osobina gela, modifikaciji rastvorljivosti proteina, adsorpciji ulja i vode, formiranju pene kao i formiranju biodegradibilnih filmova na bazi proteina

(Nielsen, 1995; Seguro i sar., 1996; Kuraishi i sar., 2000; Motoki i Kumazawa, 2000; Zhu i sar., 1995; Jaros i sar., 2006; Rosa i sar., 2011).

Kao što je ranije istaknuto, najčešća primena TG je u funkciji unapređenja sposobnosti želiranja proteina. Primenom TG želiranje proteina ima niz prednosti:

- proteini koji nisu želirali usled zagrevanja mogu da želiraju;
- gelovi koji se tope pri povišenim temperaturama, dodatkom TG ostaju u stanju gela;
- proteini u oblik emulzija ulje u vodi, u prisustvu šećera ili natrijum hlorida, želiraju;
- čvrstina gelova raste nakon zagrevanja;
- gel ne može biti rastvoren u prisustvu deterdženata ili denaturanata.

Druga funkcionalna osobina proteina koja može biti značajno unapređena primenom TG je rastvorljivost. Walsh i saradnici (2003) su dokazali da se pomoću TG vrši povećanje rastvorljivosti proteinskog izolata soje prilikom interakcije sa vodom, jer dolazi do veće izloženosti hidrofилnih grupa proteina ka rastvoru. Ali i saradnici (2010) ispitivali su funkcionalne osobine proteinskih izolata iz različitih vrsta graška polimerizovanih pomoću TG, pri različitim pH vrednostima. Rastvorljivost polimerizovanih proteina je bila znatno poboljšana u širokom rasponu pH. Takođe sposobnost emulgovanja i penušavosti ovih proteinskih izolata povećana je dejstvom TG. Pored toga, dokazano je da primena TG značajno unapređuje i druge funkcionalne osobine kao što su viskozitet i druge reološke osobine, zatim adsorpcija vode i ulja itd. Siu i saradnici (2002) dokazali su povećanje rastvorljivosti, adsorpcije vode i ulja kao i moć želiranja polimerizacijom globulina ovsu. Povećanje rastvorljivosti glutena dokazali su Agyare i saradnici (2008). Reološke osobine proteina mleka, kao i njihov uticaj u procesu pravljenja sladoleda značajno su unapređeni delovanjem TG (Rosa i sar., 2011).

### *Primena TG u industriji*

Upotreba TG u reakcijama umrežavanja proteina hrane imale su snažan fokus na proteine mleka. Ovo je delimično zbog kazeina, osnovnog proteina mleka koji je dobar supstrat za TG. Jedna od glavnih oblasti upotrebe TG u mlečnim proizvodima je proizvodnja jogurta (Lorenzen i Schlimme 1997). Glavne promene koje se dešavaju su povećanje jačine gela, odnosno viskozitet i smanjenje sinerezisa (Lorenzen i sar., 2007). Drugi vid upotrebe TG u proizvodnji mlečnih proizvoda je u proizvodnji sira. Procesom umrežavanja proteina povećava se čist prinos sira (Kuraishi i sar., 2000).

TG je sposobna da umrežavanjem molekula glutena, koji predstavlja osnovni protein u hlebu, dovodi do formiranja polimera velike molekulske mase (Larre i sar., 2000). Formiranje ovih polimera rezultuje u jačoj glutenskoj mreži što dovodi do promene fizičko-hemijskih osobina kao i reološkog ponašanja (Larre i sar., 2000.) Dodatak TG testu povećava njegovu stabilnost, zapreminu i poboljšava strukturu hleba (Wijngaards i sar., 1997).

Restruktuiranje svežeg mesa uz korišćenje TG je tehnika koja se već godinama koristi u industrijskoj proizvodnji. Vezivanje je postignuto umrežavanjem supstratnog proteinskog gela (fibrin ili kazein) što rezultira formiranjem gela između delova mesa i umreženog gela sa proteinima površine komadića mesa. Na ovaj način, manji komadići mesa se vezuju u veće u oblicima koji mogu biti podešeni. Prednost enzimske metode je u tome što su blage i što se tekstura, ukus i aroma mesa ne menjaju.

Jedna od još nedovoljno istraženih oblasti primene mikrobne TG je tretiranje vunениh tkanina i kože. Cortez i saradnici (2004) su među prvima iskoristili TG kao biokatalizator u proizvodnji vunениh tkanina. U novije vreme se koristi nova TG iz *Streptomyces hygroscopicus* u proizvodnji vune. Tretman ovim novim enzimom je poboljšao mekoću i gubitak zategnutosti vunениh vlakana.

## 2.4. Optimizacija procesa enzimske hidrolize i umrežavanja

Za optimizaciju enzimskih procesa hidrolize i umrežavanja neophodno je kontrolisati niz eksperimentalnih parametara, kao što su: pH, temperatura, koncentracija reaktanata i dr. Praćenje promena u procesu izazvanih dejstvom svakog parametra pojedinačno, iziskivalo bi dug vremenski period i ekonomski je neprihvatljivo. Takođe, nedostatak takvog vođenja eksperimenta je što ne uključuje promene koje nastaju istovremenim, uzajamnim delovanjem procesnih parametara. Za prevazilaženje ovakvih nedostataka tokom optimizaciji nekog procesa koristi se eksperimentalni dizajn, radi efikasnijeg eksperimentalnog rada. Metodologija odzivnih površina ili *eng.* Response Surface Methodology (RSM) je jedna od najčešće korišćenih metoda za optimizaciju procesa u hemijskim i biohemijskim analizama (Bas i Boyaci, 2007).

RSM predstavlja skup statističkih i matematičkih tehnika korisnih za razvoj, unapređenje i optimizaciju procesa kod kojih na izlaznu veličinu, kao odziv, ima uticaj nekoliko promenljivih veličina. RSM je našla značajnu primenu u dizajniranju, razvoju i formulaciji novih produkata, kao i unapređenju postojećih. Ona definiše efekte nezavisnih promenljivih, pojedinačno ili u kombinaciji, na proces. Takođe, u analiziranju uticaja nezavisnih parametara primenom ove eksperimentalne metodologije formiraju se matematički modeli koji opisuju hemijski ili biohemijski proces (Anjum i sar., 1997; Myers i Montgomery, 1995).

Poslednjih godina, RSM je postala veoma popularna tehnika za izučavanje optimizacije procesa. Neki od primera primene RSM u naučnoj literaturi su: hidroliza pektinskih supstrata, enzimska sinteza estara masnih kiselina, produkcija alkalnih proteaza u bioreaktoru iz *Bacillus mojavensis*, reakcije esterifikacije katalizovane dejstvom lipaza, bistrenje sokova dejstvom pektinaza itd. (Beg i sar., 2003; Boyaci i sar., 2004; Ismail i sar., 1999; Panda i Naidu, 1999; Rai i sar., 2004). RSM nema samo primenu u procesima optimizacije, takođe, koristi se za određivanje kinetičkih konstanti i ispitivanje enzimske stabilnosti (Beg i sar., 2002). Njena najveća primena je svakako u industrijskim istraživanjima, naročito u situacijama kada veliki broj varijabla utiče na neku karakteristiku sistema. RSM je naročito našla veliku primenu u kontroli enzimskih reakcija, kao što je hidroliza proteina (Xia i sar., 2007; Cao i sar., 2008; Guo i sar., 2009, Vaštag i sar., 2010; Živanović i sar., 2010), kao i enzimsko umrežavanje proteina primenom transglutaminaze (Rodriguez-Nogales, 2006; Hiller i Lorenzen, 2009).

Primenom RSM omogućuje se definisanje odzivne veličine kao funkcije niza ulaznih, promenljivih veličina, odnosno dobija se matematički polinomni model kojim se optimizira odzivna veličina. Odzivna veličina može biti predstavljena trodimenzionalnom površinom u okviru prostora eksperimentalnih promenljivih veličina i kao konturna površina u dve dimenzije.

Odnos između odziva i ulaznih parametra dat je izrazom (7):

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_n) + \varepsilon \quad (7)$$

Gde je  $\eta$  odzivna veličina,  $f$  je nepoznata funkcija odziva,  $x_1, x_2, \dots, x_n$  označavaju nezavisne promenljive,  $n$  je broj nezavisnih promenljivih i  $\varepsilon$  je statistička greška koja potiče od drugih promenljivosti koje nisu zastupljene u  $f$ .

Proces optimizaciji primenom RSM obuhvata tri nivoa.

- (I) Preliminarna ispitivanja koja se odnose na definisanje nezavisnih promenljivih i njihovih nivoa.
- (II) Izbor eksperimentalnog dizajna i predviđanje i verifikacija jednačine modela.
- (III) Dobijanje grafika odzivne površine i konturnog grafa kao funkcije nezavisnih promenljivih i određivanje optimalnih uslova.

Na hemijske i biohemijske procese utiču brojni parametri. Zbog toga što nije moguće ispitati uticaje svih parametara, neophodno je odrediti parametri koji imaju najveći uticaj. Izvođenje eksperimenta za "screening" je korisno za određivanje nezavisnih parametara. Nakon toga neophodno je odrediti nivoe, odnosno opsege nezavisnih promenljivih. Pogrešno određen nivo rezultuje neuspešnom optimizacijom. Zbog razlike u jedinicama procesnih parametara, neophodno je njihovo kodiranje, koje se izvodi primenom sledeće jednačine (8):

$$X = \frac{x - (x_{\max} + x_{\min})/2}{(x_{\max} - x_{\min})/2} \quad (8)$$

gde je  $x$  realna promenljiva,  $X$  je kodirana promenljiva a  $x_{\max}$  i  $x_{\min}$  su maksimalna odnosno minimalna vrednost realne promenljive.



Postoje različite vrste faktorskih planova: centralni kompozitni (engl. *Central Composite Design*), Graeco-Latinov, Box- Behnkenov dizajn i drugi (Francis i sar., 2003). U suštini, zajedničko im je to da su svi definisani po principu ekvivalentne raspodele ulaznih promenljivih oko date nezavisne veličine. Takođe, zbog smanjenog broja eksperimentalnih merenja, smanjuje se greška pojedinačnih merenja. Centralni kompozitni dizajn je jedan od najznačajnijih koji se koristi u izučavanju kvadratnih odzivnih površina (Myers i Montgomery, 1995).

Matematičko opisivanje ponašanja nekog sistema u RSM se izvodi polinomom drugog reda, predstavljeno sledećom jednačinom (9):

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i \cdot X_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} \cdot X_i^2 + \sum_{i < j=2}^k b_{ij} \cdot X_i \cdot X_j + \varepsilon \quad (9)$$

gde su  $b_0$  regresioni koeficijent za odsečak,  $b_i$  linerani,  $b_{ii}$  kvadratni i  $b_{ij}$  interaktivni regresioni koeficijenti,  $X_i$  i  $X_j$  su kodirane vrednosti nezavisnih promenljivih, a  $Y$  realna vrednost zavisne promenljive, odnosno odziva.

Nakon što se dobiju regresioni koeficijenti, pretpostavljeni odziv može se jednostavno izračunati korišćenjem modela jednačine. Često je ponašanje sistema nepoznato, zato se mora proveriti da li model dobro odgovara eksperimentalnim podacima. Za potvrdu adekvatnosti i verifikovanje modela, postoji nekoliko tehnika, ali najčešće se to objašnjava koeficijentom determinante ( $R^2$ ).

Prikaz predstavljenog modela jednačina može se dobiti preko trodimenzionalne površine odziva ili konturnog grafa. Odzivna površina je teoretski trodimenzioni crtež koji pokazuje odnos između odziva i nezavisnih promenljivih. Dvodimenzioni prikaz površine naziva se konturni graf. Kada konturni graf prikazuje elipse ili krugove, centar sistema odgovara tački maksimuma ili minimuma odziva (Myers i Montgomery, 1995).

Stacionarna tačka (tačka maksimuma ili minimuma) jednačine drugog reda je tačka gde je prvi izvod funkcije jednak nuli.

Ako je  $y = f(x_1, x_2)$  i

$$= \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (10)$$

Stacionarna tačka se dobija izračunavanjem izraza  $\partial y/\partial x_1$  i  $\partial y/\partial x_2$  i njihovim izjednačavanjem sa nulom:

$$\partial y/\partial x_1 = \beta_1 + 2\beta_{11}x_1 + \beta_{12}x_2 = 0 \quad (11)$$

$$\partial y/\partial x_2 = \beta_2 + 2\beta_{22}x_2 + \beta_{12}x_1 = 0$$

Izračunate vrednosti za  $x_1$  i  $x_2$  predstavljaju kodirane vrednosti nezavisnih parametara koje daju najviši ili najniži odziv. Za optimizaciju procesa, stacionarna tačka treba biti određena u testiranom opsegu nezavisnih parametara.

RSM ima nekoliko prednosti u poređenju sa klasičnim eksperimentalnim ili optimizacionim metodama. RSM nudi mnogo informacija iz malog broja eksperimenata. Takođe, moguće je posmatrati istovremeno međusoban uticaje nezavisnih parametara na odziv, što je posebno značajno za biohemijske procese kod kojih su međusobni uticaji parametara izraženiji, kao što su sinergizam, antagonizam itd. U drugu ruku, glavni nedostatak RSM je podešavanje podatke kao polinom drugog reda. Ne može se reći da su svi sistemi dobro prilagođeni polinomu drugog reda (Bas i Boyaci, 2007).

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Materijal

Reagensi i hemikalije koje su korišćene u eksperimentalnom radu su analitičke ili višeg stepena čistoće. 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karbonska kiselina (*Trolox*), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH●) radikal, N-Hipuril-His-Leu hidrat, o-ftaldialdehid (OPA), kalijum-persulfat i Dalton Mark VII su proizvodi Sigma Chemical Company (Sigma Aldrich, SAD). Enzimski preparati koji su korišćeni su svi komercijalno dostupni. Tečni, komercijalni preparati alkalaze (Protease iz *Bacillus lichenioformis*) i flavorzima (Protease iz *Aspergillus oryzae*) imaju deklarisanu aktivnosti 2,4 AU (Anson Unit)/g, i 518,8 LAUP (Leucine aminopeptidase unit)/g, respektivno. Bromelain, poreklom iz ananasa, liofiliziran prašak, ima deklarisanu aktivnosti 5-10 U/mg. Pepsin, liofilizirani prašak ima deklarisanu aktivnost (0.7 FIP-U/mg). Svi, nabrojani, proteolitički enzimski preparati su proizvodi BioChemica –Sigma-Aldrich, SAD. Enzimski preparat Transglutaminaze (Activa MP) pribavljen je od Ajinomoto Food Ingredients LLC, Japan. Mikroba Transglutaminaza poreklom je producera plesni *Streptoverticillium morbaraense*, sa deklarisanom aktivnošću od 100 U/g. Pektinaze iz *Aspergillus niger*, komercijalni naziv Pectinex ultra sp, Novo Nordisk, deklarisanu aktivnosti 26 000 galakturonske kiseline U/ml. Celulaze iz *Aspergillus niger*, proizvođač Sigma, deklarisanu aktivnosti 5.1 D-glukoza U/mg.

Seme i pogača uljane tikve golice (*Cucurbita pepo* L. c.v. Olinka) pribavljeni su od firme "Pan-Union", Novi Sad, Srbija. Pogača zaostaje kao nusproizvod ceđenja ulja iz semena uljane tikve, postupkom hladnog presovanja u pužnoj presi (kapaciteta 6kg/h). Pogača i seme uljane tikve čuvani su u frižideru (+4 °C) i pre eksperimentalne upotrebe samleveni u mlinu za kafu, pri čemu su dobijene čestice manje od 2mm.

#### 3.2. Enzimski ekstrakcioni proces

Samlevene semenke uljane tikve resuspendovane su u 0.05 mol/l fosfatnom puferu pH 5.0. Enzimski preparat koji predstavlja mešavinu pektinaza i celulaza doziran je u koncentraciji 2%. Ekstrakcija je izvedena na temperaturi 45° C sa konstantnim mešanjem od 150 rpm. Ostali parametri (odnos semke/vodena faza, veličina česica) bili su konstantni u

svim eksperimentima. Razdvajanje čvrste faze od tečne izvedeno je primenom Centrifuge "Sorvall" 14000 g, 10 minuta.

### **3.3. Vodeni ekstrakcioni process**

Samlevene semenke uljane tikve resuspendovane su u 0.05 mol/l fosfatnom puferu pH 5.0. NaCl je dodat u koncentracijama od 0 – 1%. Ekstrakcija je izvedena na temperaturi 45° C sa konstantnim mešanjem od 150 rpm. Ostali parametri (odnos semke/vodena faza, veličina česica) bili su konstantni u svim eksperimentima. Razdvajanje čvrste faze od tečne izvedeno je primenom Centrifuge "Sorvall" 14000 g, 10 minuta.

### **3.4. Priprema kukurbitin**

Protein je ekstrahovan procedurom opisanom prema Blagrove i Lilley (1980). 10 g samlevenog i obezmašćenog semena / pogače je suspendovano u 200 ml vode i konstantno mešano 3 h na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodato je 200 ml rastvora NaCl (koncentracije 100 mg/ml) i konstantno mešano 3 h na sobnoj temperaturi. Dodatkom 800 ml vode došlo je do taloženja kukurbitina. Nakon centrifugiranja pri 10 000 obrt/min, tokom 10 min, na +4 °C (Sorvall® RC-5B Refrigerated Suprespeed Centrifuge, Du Pont Instruments) talog je resuspendovan u 100 ml rastvora 1 mol/l KCl u natrijum fosfatnom puferu (0.1 mol/l, pH = 7.0). Rastvor je centrifugiran pri 10 000 obrt/min, tokom 10 min, na +4 °C (Sorvall® RC-5B Refrigerated Suprespeed Centrifuge, Du Pont Instruments). Talog je odbačen a u rastvor je dodato 200 ml vode radi taloženja kukurbitina. Ovo je ponovljeno još dva puta. Konačni proteinski talog je osušen na vazduhu u Nakon toga, sakupljeni talog je osušen na vazduhu pri sobnoj temperaturi i usitnjen do praškastog oblika.

### **3.5. Proces enzimske hidrolize**

Kukurbitin je rastvoren u puferima pH vrednosti i temperature, koji su u zavisnosti od enzima odabrani za reakciju hidrolize. Pregled reakcionih uslova koji su korišćeni u eksperimentalnom radu dat je u Tabeli 4.

**Tabela 4.** Reakcioni uslovi u procesu enzimske hidrolize primenom različitih proteaza

Enzim	Temperatura (°C)	pH	Puferski sistem
Bromelain	50	8.0	0.1 mol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /KOH
Pepsin	37	3.0	0,2 mol/l Gly/ HCl
Alkalaza	50	8.0	0.1 mol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /KOH
Flavorzim	50	7.0	0.1 mol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /KOH

U procesima enzimske hidrolize kukurbitina korišćeni su komercijalni proteolitički preparati: bromelain, pepsin, alkalaza i flavorzim. Rastvori enzima pripremljeni su rastvaranjem čvrstih ili razblaživanjem tečnih enzimskih preparata u puferima odgovarajuće pH vrednosti. Rastvori enzima su dozirani u odgovarajuće zapremine pripremljenih rastvora kukurbitina, u količini da se postignu definisani inicijalni E/S odnosi.

Reakcija enzimske hidrolize izvedena je pod strogo kontrolisanim uslovima mešanja, temperature i pH. Terminacija reakcije je izvedena termičkom inaktivacijom enzima, prokuvavanjem reakcione smeše na ključalom vodenom kupatilu tokom 5 min. Nakon prokuvavanja, reakciona smeša je centrifugirana radi razdvajanja denaturisanog dela proteina i enzima od hidrolizata, na Eppendorf Mini spin plus, pri brzini 14 500 rpm, tokom 5 min.

### 3.6. Određivanje stepena hidrolize (DH)

TCA metoda je primenjena za određivanje stepena hidrolize prema Tsumura i saradnici (1999). Metoda se zasniva na određivanju udela rastvorljivih proteina hidrolizata u rastvoru TCA, određene koncentracije. U alikvot proteinskog uzorka (hidrolizata) dodata je ekvivalentna količina hladnog rastvora TCA, koncentracije 0,44 mol/l. Smeša je stavljena u frižider (+4 °C). Nakon 30 min, talog (istaloženi proteini) odvojen je centrifugiranjem (Eppendorf Mini spin plus, pri brzini 14 500 rpm, 10 min). DH je izračunat kao odnos koncentracije rastvorljivih proteina u TCA frakciji i koncentracije ukupnih proteina u hidrolizatu, određene po metodi Lowry i saradnici (1951) (12):

$$DH(\%) = \frac{\text{Pr oteini}_{TCA}}{\text{Pr oteini}_{ukupni}} \times 100 \quad (12)$$

### **3.7. Proces umrežavanja proteina**

Reakcija enzimskog umrežavanja proteina izvedena je pod strogo kontrolisanim uslovima mešanja, temperature i pH. Suspenzija kukurbitina u 0.1 mol/l fosfatnom puferu pH=7.0, koncentracije 10 mg/ml je inkubirana na određenoj temperaturi sa dodatkom određene količine enzima-transglutaminaze (prema eksperimentalnom planu koji je prikazan u narednom poglavlju). Alikvoti (1.5 ml) su uzimani nakon 10, 30 and 50 min od početka enzimske reakcije odmah centrifugirani (Eppendorf Mini spin plus, pri brzini 4 500 rpm, 5 min) i supernatant je korišćen za dalju analizu.

### **3.8. Određivanje stepena polimerizacije (DP)**

OPA metoda je primenjena za određivanje stepena polimerizacije, zasnovano na merenju smanjenja slobodnih amino kiselina, usled procesa umrežavanja. OPA metoda se zasniva na specifičnoj reakciji o-ftalaldehida (OPA) sa primarnim aminima, u prisustvu  $\beta$ -merkptoetanela, pri čemu nastaju 1-alkiltio-2-alkil supstituisani izoindoli. Produkti reakcije se mogu detektovati fluorometrijski na  $\lambda=445$  nm ili spektrofotometrijski na  $\lambda=340$  nm Church i saradnici (1983). 40 mg OPA reagensa je rastvoreno u 1 ml etanola. Odvojeno, 1.905 g di-natrijum tetra borate dekahidrata i 50 mg natrijum dodecil sulfata je rastvoreno u 40 ml vode. Ova dva rastvora su pomešana i dopunjena vodom do ukupne zapremine od 50 ml (OPA reagens). 0.1 ml 2-merkptoetanela je pomešan sa 50 ml OPA reagensa neposredno pred analizu. U 2.5 ml ovog rastvora dodat je alikvot (50  $\mu$ l) supernatanta, dobijenog nakon enzimske reakcije umrežavanja i nakon reakcionog perioda od 2 min, na sobnoj temperaturi, apsorbanca je izmerena na  $\lambda=340$  nm (T80+ UV-Vis Spectrophotometer PG instruments LTD). DP je računat prema sledećoj jednačini (13):

$$DP(\%) = \frac{(A_K - A_{PK})}{A_K} \times 100 \quad (13)$$

Gde je  $A_K$  apsorpcija probe sa kukurbitinom na 340 nm a  $A_{PK}$  apsorpcija probe sa umreženim kukurbitinom na 340 nm.

### **3.9. Određivanje funkcionalnih osobina proteina**

#### **3.9.1. Rastvorljivost**

Rastvorljivost kukurbitina i njegovih modifikata određivana je na različitim vrednostima pH. 10 mg praškastog proteina odmereno je u Ependorf kivetama i dodato je 1 ml pufera željenih vrednosti pH. Uz povremeno mešanje na orbitalnoj mešalici (Tehtnica EV-100), uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi u trajanju od 1h. Nakon toga uzorci su centrifugirani pri 14 500 rpm u trajanju od 10 min (Ependorf Mini spin plus). Rastvorljivi proteini iz supernatanta određeni su prema Lowry i saradnici (1951) metodi.

#### **3.9.2. Emulziona stabilnost i aktivnost**

Emulzije su pripremljene homogenizacijom 100 ml rastvora proteina koncentracije 1 mg/ml i 50 g komercijalnog rafinisanog suncokretovog ulja, pri 6500 rpm u trajanju od 5 min (Ultra-Turrax T 25). Indeksi emulziona stabilnosti (ESI) i aktivnost (EAI) određivani su prema metodi Pearce i Kinsella (1978). Nakon formiranja emulzije uziman je alikvot od 50 µl i odmah mešan sa 5 ml 0.01 mol/l natrijum fosfatnog pufera pH 7.0 koji sadrži 0.1 % SDS. ). Nakon 10 minuta ponovljen je postupak. EAI je izražavan kao apsorpcija rastvora dobijenog mešanjem alikvota u 0-tom minutu, merena na  $\lambda=500$  nm (T80/T80+ UV-Vis Spectrophotometer PG instruments LTD). ESI je računat prema sledećoj jednačini (14)

$$ESI = A_0 \times t / (A_0 - A_{10}) \quad (14)$$

Gde je:  $A_0$  apsorpcija u 0 min nakon formiranja emulzije,  $A_{10}$  apsorpcija nakon 10 min od formiranja emulzije.

#### **3.9.3. Kapacitet i stabilnost pene**

Količina od 0.5 g uzorka proteina je resuspendovana u 50 ml pufera odgovarajuće pH vrednosti uz dodatak NaCl u količini potrebnoj za postizanje određene jonske jačine. Smeša je homogenizovana pomoću ultraturaksa (Ultra-Turrax T25) pri 5000 rpm u trajanju 2 minuta. Nakon toga ukupna zapremina je odmah prebačena u graduisani cilindar. Zapremina je merena pre i nakon 1, 10, 30, 60 i 90 minuta posle formiranja pene. Kapacitet pene („Foam

capacity“ FC) je izražen u procentima kao udeo zapremine pene u ukupnoj zapremini (x100). Stabilnost pene (Foam stability FS) izražena je kao vrednost FC u različitim vremenskim intervalima (1, 10, 30, 60 i 90 min).

#### **3.9.4. Adsorpcija ulja i vode**

Biljno ulje (9 g) dodato je u prethodno odvagane centrifuške kivete u kojima se nalazilo 1g uzorka proteina. Sadržaj kiveta je promešan koristeći orbitalnu mešalicu (Tehtnica EV-100). Uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi u trajanja od 30 min. Nakon toga izvršeno je centrifugiranje pri 4000 rpm (Sorvall RC-5B Centrifuge) u trajanju od 20 min. Ulje je uklonjeno odlivanjem iz kiveta i njihovim potpunim okretanjem radi ceđenja. Kivetama sa uzorcima je nakon toga opet izmerena masa. Adsorbovano ulje predstavlja razliku u masi uzorka proteina i izraženo je kao gram ulja po ramug suvog uzorka.

Postupak za određivanje vezane vode je identičan prethodnom, s tim da se voda dodaje u količini od 10 ml na 1 g suvog uzorka proteina.

#### **3.9.5. Želiranje**

Sposobnost želiranja merena je i izražena veličinom: minimalna koncentracija potrebna za želiranje (The least gellation concentration, LGC). Određene količina proteina su suspendovane u 1 ml fosfatnog pufera pH 7.0, koncentracije 0.01 mol/l da bi se postigle koncentracije 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 i 18 % (w/v). Kivete sa suspenzijama zagrevane su 1 h u ključalom vodenom kupatilu. Nakon toga su naglo hlađeni na temperaturu od 4 °C . Na toj temperaturi držani su narednih 2h. Kao vrednost za LGC uzimana je ona najmanja koncentracija pri kojoj nije isurela zapremina uzorka iz kivete nakon njenog izvrtnja.

### **3.10. Određivanje antioksidativne aktivnosti proteinskih hidrolizata**

#### **3.10.1. Antiradikalska aktivnost prema ABTS<sup>•+</sup> radikal katjonu**

Antiradikalska aktivnost proteinskih hidrolizata prema ABTS<sup>•+</sup> radikal katjonu određena je spektrofotometrijskom metodom, na osnovu obezbojavanja zelenog rastvora ABTS<sup>•+</sup> radikal katjona u prisustvu proteinskih hidrolizata, na  $\lambda=734$  nm. Antiradikalska aktivnost proteinskih



hidrolizata prema  $ABTS^{\bullet+}$  radikal katjonu ispitana je metodom opisanom prema Re i saradnici (1999). Osnovni rastvor  $ABTS^{\bullet+}$  radikal katjona pripremljen je rastvaranjem ABTS-a u 0.1 mol/l fosfatnom puferu, pH 7.4, koji sadrži 5 mmol/l NaCl. ABTS je dodat u koncentraciji 7 mmol/l, a zatim je dodat kalijum-persulfat, kao inicijator produkcije  $ABTS^{\bullet+}$  radikal katjona, u koncentraciji od 2,45 mmol/l. Rastvor je čuvan na tamnom mestu tokom 12 do 24 h. Radni rastvor  $ABTS^{\bullet+}$  radikal katjona pripremljen je pred analizu, razblaživanjem osnovnog rastvora, dok nije postignuta apsorbancija u vrednosti od  $0.7 \pm 0.02$  na  $\lambda = 734$  nm. U 3 ml radnog rastvora  $ABTS^{\bullet+}$  radikal katjona, dodato je po 30  $\mu$ l hidrolizata. Obezbojavanje reakcione smeše praćeno je merenjem apsorpcije na  $\lambda = 734$  nm (T80 + UV -Vis Spectrophotometer, PG instruments LTD) tokom 10 min. Paralelno sa svakom probom, praćeno je i obezbojavanje u slepoj probi, pripremljenoj dodavanjem odgovarajućeg pufera u radni rastvor  $ABTS^{\bullet+}$  radikal katjona, umesto hidrolizata. Na osnovu apsorbancija u probi i slepoj probi nakon 10 min reakcije, antiradikalska aktivnost hidrolizata izračunata je prema sledećoj jednačini (15):

$$(15)$$

gde su  $A_{H20}$ —apsorbancija u slepoj probi, a  $A_t$ —apsorbancija u probi sa hidrolizatom ( $t=10$  min). Kod svih hidrolizata antioksidativna aktivnost  $ABTS^{\bullet+}$  ispitana je u funkciji različitih početnih koncentracija proteina u hidrolizatima i upoređena je sa antiradikalskom aktivnošću vodorastvorljivog analoga vitamina E, troloksa, kao standardne supstance. Za izračunavanje tzv. „Troloks ekvivalenta“ (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*, TEAC) utvrđena je zavisnost antioksidativne aktivnosti  $ABTS^{\bullet+}$  i poznatih koncentracija troloksa, u opsegu koncentracija troloksa od 0 do 2,49 mmol/l. TEAC vrednost hidrolizata određena je količnikom nagiba prave zavisnosti antioksidativne aktivnosti  $ABTS^{\bullet+}$  i koncentracije proteina u hidrolizatima i nagiba prave zavisnosti antioksidativne aktivnosti  $ABTS^{\bullet+}$  i koncentracije troloksa. TEAC hidrolizata izražen je kao mM TEAC po mg proteina u proteinskom uzorku (hidrolizatu).

### 3.10.2. Redukcija Fe<sup>3+</sup> jona - Redukujuća moć

Primenom metode za određivanje redukujuće moći (engl. *Reducing power*, RP) utvrđuje se sposobnost proteinskih komponenti da redukuju feri (Fe<sup>3+</sup>) u fero (Fe<sup>2+</sup>) jone. Fe<sup>3+</sup> jon potiče iz kompleksa kalijum-fericijanida (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]), a pri transformaciji Fe<sup>3+</sup> u Fe<sup>2+</sup> formira se kalijum-ferocijanid, K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (*Perl's Prussian blue*) i boja rastvora se menja iz žute do zelene i plave boje. Apsorbanca na λ=700 nm je direktno merilo količine nastalog Fe<sup>2+</sup> jona. RP proteinskih hidrolizata ispitana je modifikovanom metodom po Moure i saradnici (2006a). Na 1 ml hidrolizata dodato je u 2.5 ml fosfatnog pufera (pH 6.60 i koncentracije 0.2 mmol/l) i 2.5 ml 1%-nog rastvora kalijum-fericijanida. Slepa proba je pripremljena dodavanjem 1 ml odgovarajućeg pufera, umesto hidrolizata. Smeše su inkubirane na 50 °C, tokom 20 min i nakon dodavanja 2.5 ml 10%-nog rastvora TCA, centrifugirane pri 10 000 obrt/min, 5 min, na +4 °C (Sorvall® RC - 5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments). Supernatant je razblažen destilovanom vodom u zapremiskom odnosu 1:1, a zatim je dodat 0.1 %-ni rastvor gvožđe-III hlorida u odnosu 10:1. Nakon inkubiranja na 50 °C tokom 10 min, apsorbanca je očitana na λ=700 nm (T80 + UV -Vis Spectro-photometer, PG instruments LTD).

### 3.11. SDS-gel elektroforeza

Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza (engl. *SDS-PAGE*) izvedena je po metodi Laemmli (1970). Sistem gela čine 4% (w/v) akrilamidni gel za uzorke i 10% akrilamidni separacioni gel. Uzorci (po 1mg/ml proteina) rastvoreni su u Tris/Glicinu (pH 8,90) koji sadrži 20 g/l SDS-a i 50 g/l β-merkaptetanola. Elektroforeza je izvedena na aparaturi Pharmacia LKB-Multi Drive XL, pri 100 mA, u vremenu potrebnom da uzorci stignu do donje ivice gela. Gelovi su bojeni rastvorom koji sadrži 10% (v/v) sirćetne kiseline, 50% (v/v) metanola i 0,2% (w/v) *Coomassie brilliant blue* R-250 u trajanju od 1h. Gelovi su zatim obezbojavani sa rastvorom koji sadrži 10% (v/v) sirćetne kiseline i 40% (v/v) metanola.

### 3.12. Statistička obrada podataka

Za obradu eksperimentalnih podataka korišćeni su kompjuterski softverski programi Microsoft Excel 7 i STATISTICA 8 (StatSoft, 8). Svi rezultati u radu su prikazani kao srednja

vrednost tri nezavisna merenja  $\pm$  standardna devijacija (SD), ukoliko to nije naznačeno drugačije. Statistička značajnost razlika između srednjih vrednosti  $\pm$  SD testirana je primenom Studentovog t-testa, na nivou značajnosti od 5% ( $p < 0,05$ ) korišćenjem STATISTICA 8 (StatSoft, 8). U RSM, za kodiranje nezavisno promenljivih veličina (parametara procesa) korišćena je opšta jednačina (16):

$$X = \frac{x - \left( \frac{x_{\max} + x_{\min}}{2} \right)}{\frac{x_{\max} + x_{\min}}{2}} \quad (16)$$

gde su:  $X$  - kodirana vrednost promenljive (u opsegu od -1 do 1),  $x$  – realna vrednost odabrane promenljive, a  $x_{\max}$  i  $x_{\min}$  realne maksimalne, odnosno minimalne vrednosti promenljivih, u odabranom opsegu za ispitivanje.

Za opis funkcije zavisnosti primenjena je opšta jednačina, polinom drugog reda (17):

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i \cdot X_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} \cdot X_i^2 + \sum_{i < j=2}^k b_{ij} \cdot X_i \cdot X_j + \varepsilon \quad (17)$$

gde je,  $Y$  predviđena, realna vrednost izlazne veličine,  $x_i$  kodirane vrednosti nezavisno promenljivih,  $b_0$  nezavisni član jednačine,  $b_i$  regresioni koeficijenti uz linearni ( $x_i$ ) i  $b_{ii}$  regresioni koeficijenti uz kvadratni ( $x_i^2$ ) član svake promenljive  $x_i$ , a  $b_{ij}$  regresioni koeficijenti uz interaktivne članove po dve nezavisno promenljive. Statistička obrada eksperimentalnih podataka i crtanje odzivnih površina urađeno je u okviru softverskog paketa, STATISTICA 8 (StatSoft, 8).

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

Istraživanja u okviru ove disertacije fokusirana su na razvoj enzimskih procesa modifikacije globulina uljane tikve goliće (*Cucurbita pepo*), kukurbitina, sa dva aspekta:

- (I) enzimski hidroliza primenom proteolitičkih enzima i
- (II) enzimsko umrežavanje primenom enzima tipa transferaza (transglutaminaze).

Kontrola i optimizacija oba enzimski procesa je izvedena u cilju dobijanja proteinskih modifikata ciljanih funkcionalnih karakteristika.

### 4.1. Proteinski sastav semena uljane tikve (*Cucurbita pepo*)

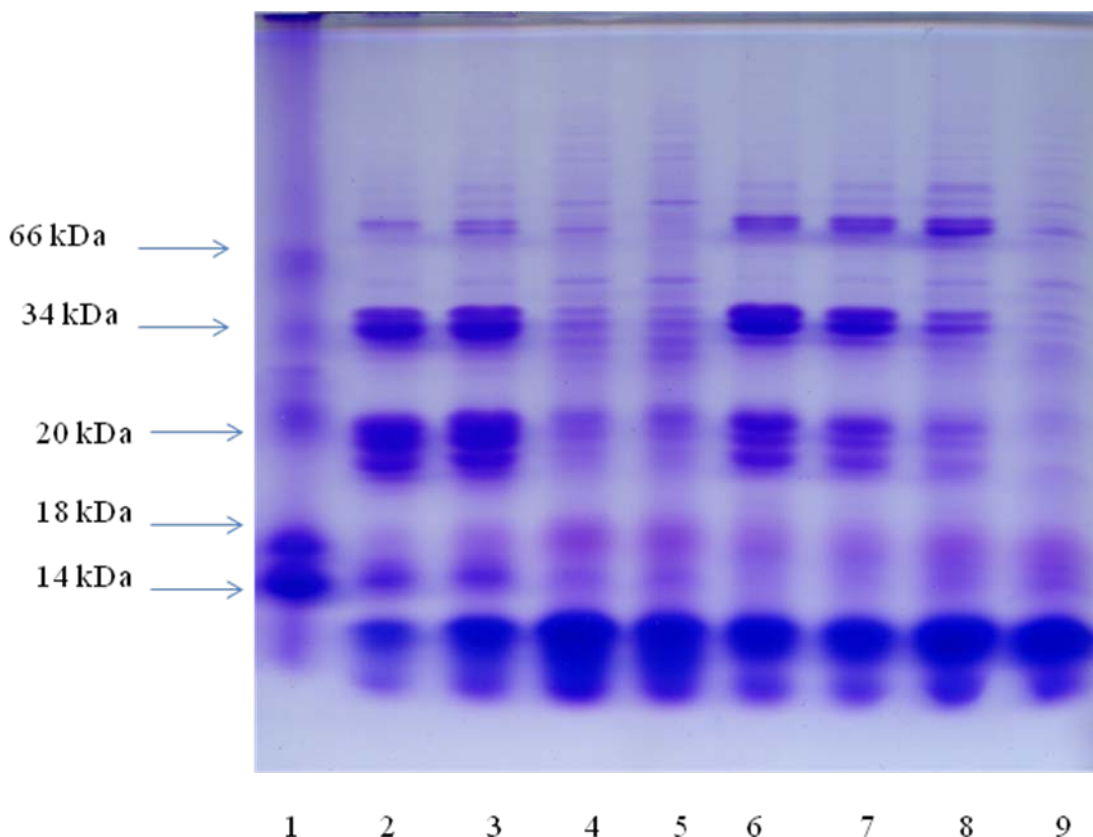
Seme uljane tikve slično kao i druge uljarice ima kompleksnu strukturu ćelija. Pored ćelijskog zida i citoplazme unutar ćelije nalaze se organele koje sadrže lipide i proteine. Proteini su smešteni u vakuolama ili proteinskim telašcima i predstavljaju glavni izvor aminokiselina za proces klijanja semena (Rosenthal i sar, 1996). Za ekstrakciju proteina iz ćelija neophodna je razgradnja ćelijskih membrana proteinskih telašaca. Ekstrakcija proteina može biti poboljšana parcijalnom hidrolizom biljnog ćelijskog zida delovanjem odgovarajućih enzima, poznatih pod nazivom "Cell-Wall Degrading Enzymes" (CWDE). Ovi enzimi su smeša složenih kompleksa karbohidrolaza kao što su celulaze, pektinaze i hemicelulaze. Takođe, za proces ekstrakcije proteina veliku ulogu imaju osobine medijuma, pH i jonska jačina, odnosno faktori koji utiču na rastvorljivost proteina.

Određivanje proteinskog sastava semena uljane tikve (*Cucurbita pepo*) izvedeno je procesima izolovanja i vodenom ekstrakcijom sa CWDE, kao i njihovom kombinacijom. Sastav ekstrahovanih proteina analiziran je gel elektroforezom (Slike 12).

Ekstrakcija proteina izolovanjem izvedena je primenom različitih koncentracija NaCl u opsegu od 0.1 do 1.0 % (w/w). SDS-elektroforezom dokazano je prisustvo 10 polipeptidnih lanaca molekularskih masa od 80 do 5 kDa (linije 6, 7, 8 i 9). Vodeći proteini u dobijenom ekstraktu su proteini molekularskih masa od  $M_r \sim 30$  i 20 kDa, što odgovara globulinskim frakcijama.

Proteini rastvorljivi u solima, odnosno globulini ekstrahuju se već kod koncentracije NaCl od 0.5 %. Uočavaju se dve klase polipeptidnih podjedinica molekularskih masa 33.0 kDa

i 22.0 kDa. Pretpostavlja se da one potiču od kiselih i baznih polipeptidnih lanaca kukurbitina, respektivno. Sa Slike 12 jasno se vidi da je globulinska frakcija dominantna proteinska komponenta semena uljane tikve (*Cucurbita pepo*), odnosno kukurbitin je glavni rezervni protein.



**Slika 12.** Elektroforetski profil solubilizovanih proteina dobijenih tokom ekstrakcije iz semena uljane tikve tretmanom sa i bez prisustva enzima i NaCl. 1: Markeri molekulskih masa; 2: 1% NaCl i 2% enzimske smeše; 3: 0.5% NaCl i 2% enzimske smeše; 4: 0.1% NaCl i 2% enzimske smeše; 5: 0% NaCl i 2% enzimske smeše; 6: 1% NaCl, bez enzima, t=390min; 7: 1% NaCl, bez enzima, t=150min; 8: 0.5% NaCl, bez enzima, t=150min; 9: 0.1% NaCl, bez enzima, t=150min

Elektroforetski profil proteinskih ekstrakata dobijenih vodenim enzimskim procesom sa CWDE i kombinovan sa dodatkom soli u opadajućim koncentracijama prikazan je linijama 5, 2, 3 i 4, respektivno. Enzimskim tretmanom dolazi do ekstrakcije peptidi malih

molekulskih masa od 10 do 5kDa, dok se globulinska komponenta ne uočava. Tek u kombinovanom postupku uz dodatak soli dolazi do ekstrakcije globulina, tj. kukurbitina.

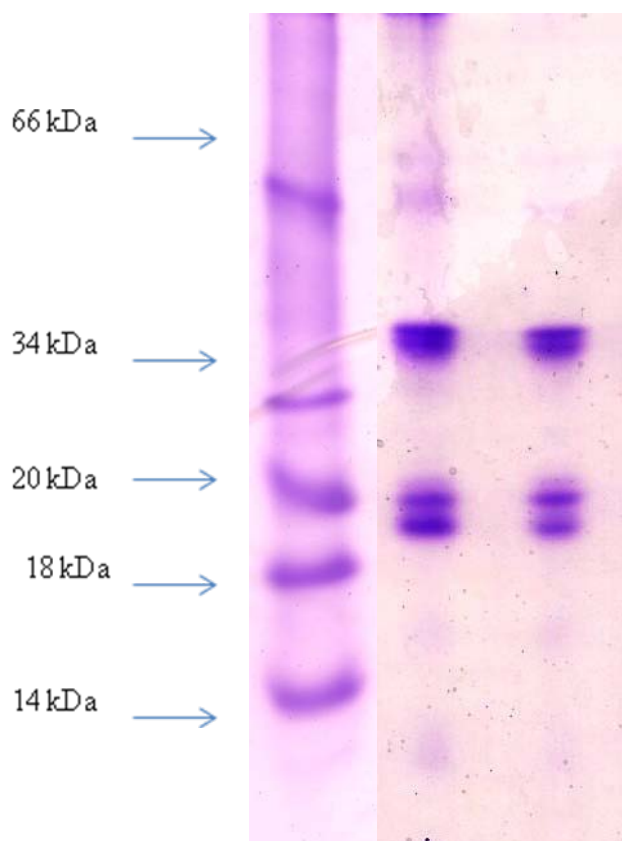
Dobijeni rezultati jasno upućuju na to da metoda izolovanja predstavlja pogodniju tehniku za ekstrakciju globulinske komponente, kao glavne proteinske frakcije semena uljane tikve (*Cucurbita pepo*) u odnosu na enzimski tretman. Takođe, tehnika izolovanja ima prednosti i sa ekonomskog stanovišta, kao jeftinija i brža metoda.

#### **4.2. Izolovanje i komparativna ispitivanja funkcionalnih osobina kukurbitina dobijenog iz semena i pogače uljane tikve (*Cucurbita pepo*)**

Kao što je u prethodnom poglavlju utvrđeno globulinska komponenta, tkz. kukurbitin predstavlja dominantnu proteinsku frakciju u semena uljane tikve. Kao izvor za izolovanje proteina, pored semena, koristi se i uljana pogača koja zaostaje kao nusproizvod u procesu ekstrakcije ulja. Kada se kao izvor proteina koriste uljane pogače, prisutan je problem slabe rastvorljivosti, jer dolazi do značajne denaturacije nativnih proteina u toku procesa ekstrakcije ulja (Chabanon i sar., 2007; Gonzales-Perez i Vereijken, 2007). Iz tih razloga izvedena su komparativna ispitivanja osobina kukurbitina dobijenog iz semena i iz pogače uljane tikve (*Cucurbita pepo*, cv. Olinka). Ispitana je rastvorljivost u celom opsegu pH vrednosti, zatim sposobnost formiranja emulzije i pene, kao i njihova stabilnost, apsorpcija ulja i vode.

Metodom prema Blagoreve i Lilley (1980) izvršena je ekstrakcija kukurbitina iz semena i iz pogače uljane tikve golice (*Cucurbita pepo*). Količina ekstrahovanog kukurbitina iz semena mnogo je veća nego iz pogače i iznosi 46,13 mg/g, dok je kod pogače svega 3,145 mg/g. Ovako nizak sadržaj kukurbitina iz pogače, pretpostavlja se da je posledica denaturacije proteina nastele usled mehaničkih tretmana nad semenom u procesu ekstrakcije ulja.

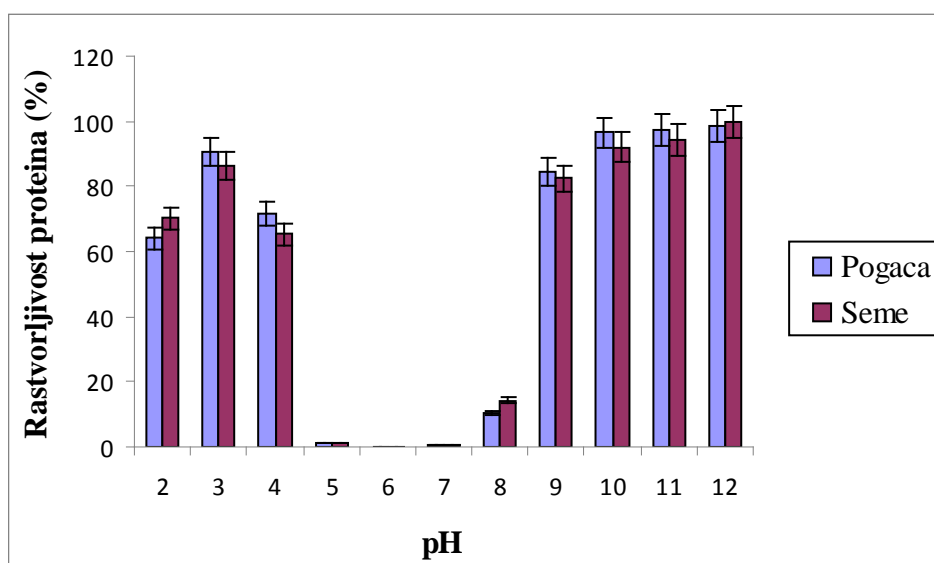
Struktura izdvojenih proteina analizirana je SDS elektroforezom. Elektroforetogram kukurbitina dobijenog iz oba izvora prikazan je na Slici 13. Kod oba uzorka (linije 2 i 3) uočavaju se dve klase polipeptidnih podjedinica molekulskih masa  $M_r = 33.0$  kDa i  $22.0$  kDa, koje odgovaraju kiselom i baznom polipeptidnom lancu kukurbitina, respektivno. Analizom elektroforetograma vidi se, da bez obzira na izvor iz kog je ekstrahovan, nema promene u nativnoj strukturi kukurbitina.



**Slika 13.** Elektroforetski profili kukurbitina iz semena i pogače uljane tikve. Markeri molekulskih masa 1; kukurbitin iz pogače 2; kukurbitin iz semena 3.

### Rastvorljivost kukurbitina

Rastvorljivost kukurbitina, dobijenog iz semena i pogače uljane tikve, u funkciji pH vrednosti prikazana je na Slici 14. pH profili rastvorljivosti kukurbitina iz oba izvora imaju tipičan U-oblik, koji je karakterističan kod većine biljnih globulina. Kukurbitin izolovan iz pogače i iz semena odlikuje se veoma malom rastvorljivošću u pH opsegu od 5.0 – 8.0 (od 0.1 do 0.25 mg/ml) dok se visoka rastvorljivost postiže na ekstremnim pH vrednostima, kiselim i baznim (do 10 mg/ml). Sličan rezultat su reportovali Khalid i saradnici (2003) izučavajući rastvorljivost proteinskog izolata semena susama i Gruener i Ismond (1997) za globulin uljane repice (kruciferin). Povećanje rastvorljivosti ovih proteina u umerenim vrednostima pH, bliskim neutralnim, postiže se, najčešće promenom jonske jačine, odnosno dodatkom soli.



**Slika 14.** Rastvorljivost kukurbitina, dobijenog iz semena i pogače uljane tikve, u funkciji pH.

Dobijeni rezultati pokazuju da razlike u rastvorljivosti kukurbitina iz oba izvora nisu statistički značajne ( $p < 0.05$ ) što dokazuje da procesom ekstrakcije ulja nije došlo do promena u strukturi preostalog kukurbitina koje bi uticale na njegovu rastvorljivost.

pH profil rastvorljivosti proteina predstavlja praktičan pokazatelj denaturacije i takođe, ukazuje na potencijal proteina kao funkcionalnog ingredijenta zbog uticaja koji ima na ostale funkcionalne karakteristike proteina (osobine emulzije, pene i želiranja). Ovakav pH profil rastvorljivosti kukurbitina ukazuje na mogućnost njegove primenu isključivo u izrazito alkalnim i kiselim područjima, dok je na neutralnim pH vrednostima neophodno prisustvo određene jonske jačine za povećanje rastvorljivosti, a time i povećanje drugih funkcionalnih osobina kukurbitina.

### **Funkcionalne osobine kukurbitina**

Funkcionalne osobine kukurbitina dobijenog iz semena i pogače uljane tikve, kao što su: emulziona aktivnost i stabilnost, kapacitet pene, apsorpcija ulja i vode, određeni su i rezultati prikazani u Tabeli 5.

Emulzione osobine kukurbitina izražene su kao indeks emulzione aktivnosti (EAI), meren kao vrednost apsorpcije na 500nm i indeks emulzione stabilnosti (ESI). Kukurbitin iz pogače pokazuje nešto veću vrednost EAI od kukurbitina iz semena, dok oba izvora imaju gotovo iste vrednosti ESI. Vrednosti EAI kukurbitina su istog reda veličine sa vrednostima dobijenim za



proteine soje i uljane repice (Xu i Diosady, 1994), dok ESI kukurbitina ima skoro dva puta veću vrednost od sojinog proteina (Hojila-Evangelista i sar., 2004).

**Tabela 5.** Funkcionalne osobine kukurbitina izolovanog iz semena i pogače uljane tikve.

Funkcionalne osobine	Kukurbitin	
	Seme	Uljana pogača
EAI ( $A_{500nm}$ )	$0.411 \pm 0.04$	$0.334 \pm 0.06$
ESI (min)	$27.0 \pm 1.51$	$28.2 \pm 1.21$
WAC (g/g <sub>sm</sub> )	$0.98 \pm 0.05$	$1.03 \pm 0.02$
OAC (g/g <sub>sm</sub> )	$0.679 \pm 0.02$	$0.767 \pm 0.02$
LGC (%)	$6.0 \pm 0.0$	$8.0 \pm 0.0$
FC (%)	$92.0 \pm 2.45$	$70.0 \pm 3.11$

Kapacitet pene (FC) kukurbitina u poređenju sa drugim biljnim proteinima znatno je niži. Dev i Mukherje (1986) su dokazali za proteine uljane repice mnogo veće vrednosti FC, a takođe, u poređenju sa proteinom sojinog semena, kukurbitin ima manje vrednosti FC (Hojila-Evangelista i sar., 2004). Poređenjem vrednosti FC kukurbitina iz semena i pogače zapaža se da kukurbitin iz semena ima veću vrednost za oko 30% od kukurbitina dobijenog iz uljane pogače. Razlog tome mogu biti promene nastale u predtretmanu koji je imala pogača, jer je poznato da na ispitivane funkcionalne osobine utiču različite osobine molekula, kao što su hidrofobnost, fleksibilnost i oblik molekula.

Kapacitet adsorpcije vode (WAC) i ulja (OAC) predstavlja indeks koji pokazuje sposobnost proteina da adsorbuje i zadrži vodu, odnosno ulje. Dobijeni rezultati pokazuju da vrednosti WAC i OAC kukurbitina iz pogače nisu statistički značajno ( $p < 0.05$ ) veći od vrednosti koje ima kukurbitin iz celog semena. U poređenju sa rezultatima iz literature dobijenim za proteine iz graška (Simner i sar., 1980), suncokreta (Lin i sar., 1974) i semena *Rosa rubiginosa* (Moure i sar., 2001) OAC kukurbitina ima znatno niže vrednosti, dok vrednosti kukurbitina za WAC su slične onim iz navedene literature.

Iz prethodnih rezultata može se zaključiti da kukurbitin dobijen iz uljane pogače ima gotovo iste vrednosti ispitivanih funkcionalnih osobina kao i kukurbitin izolovan iz semena. Prema tome uljana pogača koja se dobija kao nusproizvod u procesu hladnog ceđenja ulja iz semena uljane tikve (*Cucurbita pepo*) može uspešno da se koristi kao izvor za izolovanje kukurbitina koji ima iste karakteristike kao i onaj iz semena, a samim tim ima i identičan potencijal za moguću primenu u formulacijama hrane.

### 4.3. Optimizacija uslova za povećanje rastvorljivosti kukurbitina

Rastvorljivost, kao što je već prethodno rečeno, je jedna od najznačajnijih osobina proteina, koja ima direktan uticaj na veliki broj drugih funkcionalnih osobina. Na rastvorljivost proteina utiče niz faktora kao što su: pH, temperatura, jonska jačina, vrsta soli ili rastvarača, odnos čvrste i tečne faze itd. (Mizubiti i sar., 2000). Kada mnoštvo faktora istovremeno ima uticaj na vrednost određene veličine, tada metoda odzivnih površina (RSM) predstavlja efikasan način za definisanje njihovih optimalnih vrednosti (Triveni i sar., 2001).

#### Modelovanje procesa rastvaranja kukurbitina

Uticaj pH, temperature i koncentracije natrijum hlorida na rastvorljivost kukurbitina ispitan je metodom odzivnih površina. Korišćen je „full-factorial“ eksperimentalni plan sa tri faktora na tri nivoa. Opseg i centralne tačke nezavisnih promenljivih, izabranih prema rezultatima preliminarnih ispitivanja, prikazani su u Tabeli 6.

**Tabela 6.** Procesni parametri i njihovi nivoi korišćeni u metodi odzivnih površina za ispitivanje rastvorljivosti kukurbitina

Procesni parametri	Nivoi		
	pH, ( $x_1$ )	6.0	7.0
Koncentracija NaCl (%), ( $x_2$ )	3.0	4.0	5.0
Temperatura (°C), ( $x_3$ )	20	50	80

Sledeća jednačina (18) predstavlja empirijsku zavisnost između rastvorljivosti proteina (Y) i procesnih parametara:

$$Y = -113.079 + 13.61704x_1 + 28.27207x_2 + 0.491595x_3 - 0.70221x_1^2 - 2.96938x_2^2 - 0.00307x_3^2 - 0.50643x_1x_2 - 0.014475x_1x_3 - 0.012047x_2x_3 \quad (18)$$

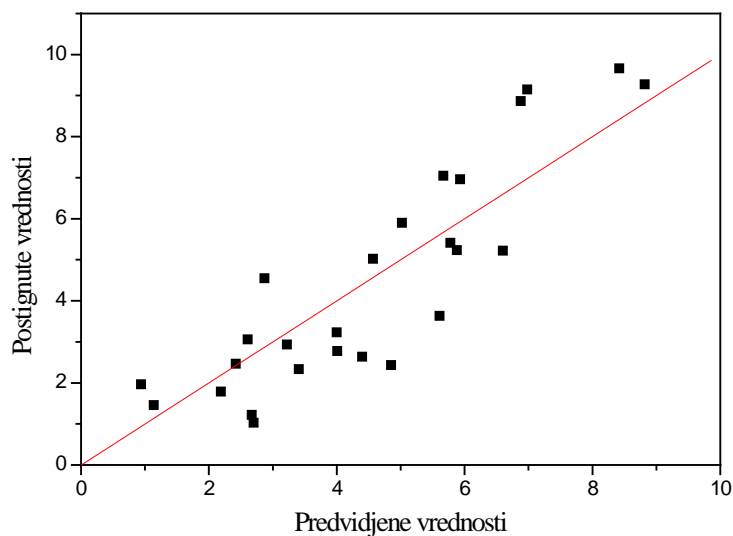
Rezultati primena ANOVA za ispitivanje značajnosti linearnih, kvadratnih i efekata interakcije tri izabrana nezavisna parametra ( $x_1$ ,  $x_2$ , i  $x_3$ ) na rastvorljivost kukurbitina, kao i značajnost celog polinomnog modela prikazani su u Tabeli 7. Na osnovu *t*- i *p*-vrednosti može

se zaključiti da model, sa stanovišta statistike, daje dobro predviđanje eksperimentalnih podataka. Promenljive koje imaju statistički najveći značaj ( $p$ -vrednost  $< 0,05$ ) su linearni član koncentracije NaCl ( $x_2$ ) i kvadratni član koncentracije NaCl ( $x_2x_2$ ).

**Tabela 7.** Koeficijenti regresione jednačine za rastvorljivost kukurbitina

Parametri	Regresioni koeficijenti	Standardna devijacija	$t$ -vrednosti	$p$ - vrednosti
$b_0$	-113.0790	37.950	-2.980	0.008
<i>Linearni</i>				
$b_1$	13.6170	9.8131	1.3875	0.1832
$b_2$	28.2720	6.4970	4.3515	0.0004
$b_3$	0.4915	0.1526	3.2202	0.0050
<i>Kvadratni</i>				
$b_4$	-0.7022	0.6844	-1.0260	0.3192
$b_5$	-2.9693	0.6844	-4.3386	0.0004
$b_6$	-0.0031	0.0008	-3.9017	0.0011
<i>Interakcija</i>				
$b_7$	-0.5064	0.4839	-1.0464	0.3099
$b_8$	-0.0144	0.0160	-0.9014	0.3799
$b_9$	-0.0121	0.0160	-0.7502	0.4633
R	0.9664			
R <sup>2</sup>	0.934			

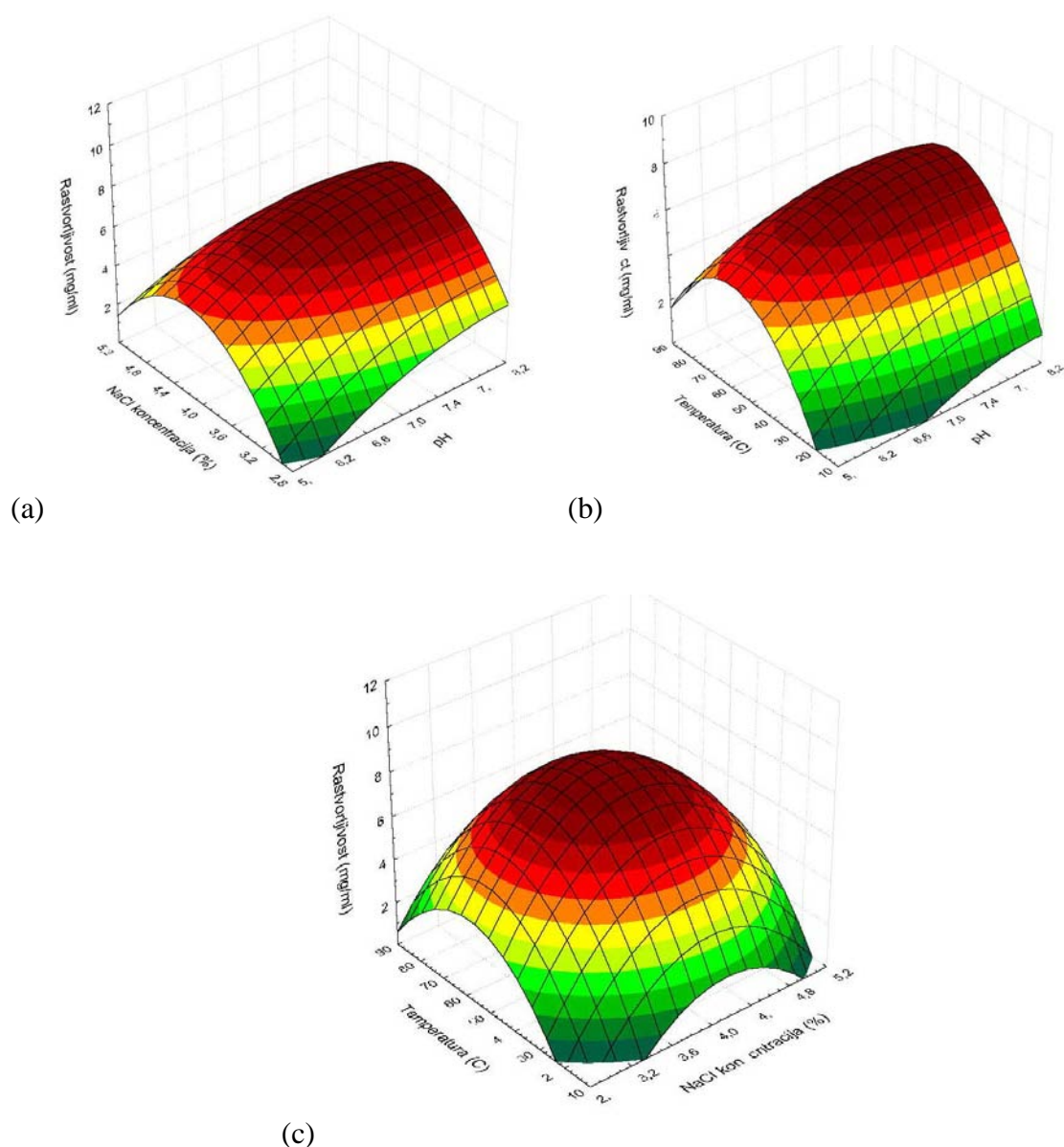
Visoke vrednosti koeficijenta korelacije ( $R = 0.9664$ ) i koeficijenta determinacije ( $R^2 = 0.934$ ) ukazuju na adekvatno fitovanje eksperimentalnih rezultata polinomom drugog reda. Grafik zavisnosti postignutih vrednosti eksperimentalno i vrednosti dobijenih na osnovu jednačine (engl. Parity plot) prikazan je na Slici 15. U slučaju adekvatno predviđene jednačine dobija se visoka linearna zavisnost između ovih vrednosti. “Parity plot” pokazuje linearnu korelaciju između predviđenih i eksperimentalno određenih vrednosti rastvorljivosti kukurbitina.



**Slika 15.** „Parity plot“ postignutih i predviđenih vrednosti rastvorljivosti kukurbitina

### Optimizacija procesa

3D dijagrami odzivnih površina (Slika 16) prikazuju zavisnost zavisne promenljive (rastvorljivost kukurbitina) od glavnih i uzajamnih efekata nezavisnih promenljivih. Jedna od promenljivih je zadržana na centralnom nivou, dok su se druge dve menjale u okviru eksperimentalnog opsega. Generalno, analiza odzivnih površina ukazuje da postoji kompleksna interakcija između promenljivih (Morgan, 1991). Uticaj pH i koncentracije soli na rastvorljivost kukurbitina prikazan je na Slici 16(a). Koncentracija NaCl ima kvadratni efekat na rastvorljivost proteina, dok pH ima gotovo linearan efekat. Slika 16(b) prikazuje uticaj pH i temperature; rastvorljivost raste sa porastom vrednosti pH dok temperatura ima kvadratni efekat na izlaznu veličinu. Uticaj koncentracije soli i temperature na rastvorljivost proteina se vidi sa Slike 16(c); ovi rezultati pokazuju da funkcija odzivne površine ima vrednost maksimuma u ispitivanom opsegu.



**Slika 16.** 3D grafici odzivnih površina zavisnosti rastvorljivosti kukurbitina od (a) pH vrednosti i koncentracije natrijum hlorida; (b) pH vrednosti i temperature; (c) koncentracije natrijum hlorida i temperature..

Maksimalna vrednost rastvorljivosti kukurbitina (7.549 mg/ml) se postiže u opsegu koncentracije soli od 3.do 4.5 % i pri temperaturama od 40 do 70 ° C.

Precizne koordinate maksimuma funkcije su dobijene analitičkom procedurom, odnosno, definisanjem takozvanih neophodnih uslova. Kada se parcijalni izvodi regresione jednačine (18) izjednače sa nulom, sledeći sistem jednačina (19) se formira:

$$\begin{aligned}\frac{\partial Y}{\partial x_1} &= 13.617 - 1.4044x_1 - 0.5064x_2 - 0.0144x_3 = 0 \\ \frac{\partial Y}{\partial x_2} &= 28.272 - 0.5064x_1 - 5.93876x_2 - 0.012x_3 = 0 \\ \frac{\partial Y}{\partial x_3} &= 0.4916 - 0.144x_1 - 0.012x_2 - 0.0061x_3 = 0\end{aligned}\quad (19)$$

Rešenja jednačina 19 predstavljaju kodirane vrednosti ulaznih promenljivih  $x_1$ ,  $x_2$  i  $x_3$  za optimum, odnosno maksimum rastvorljivosti kukurbitina. Kada se ove vrednosti uvrste u jednačinu 18, dobija se realna, maksimalna vrednost rastvorljivosti kukurbitina koja iznosi 9.091 mg/ml (Tabela 8). Realne vrednosti procesnih parametra pri kojima se postiže maksimalna rastvorljivost kukurbitina prikazane su u Tabeli 8. Ovi uslovi su definisani kao optimalni uslovi za dobijanje maksimalne vrednosti rastvorljivosti kukurbitina.

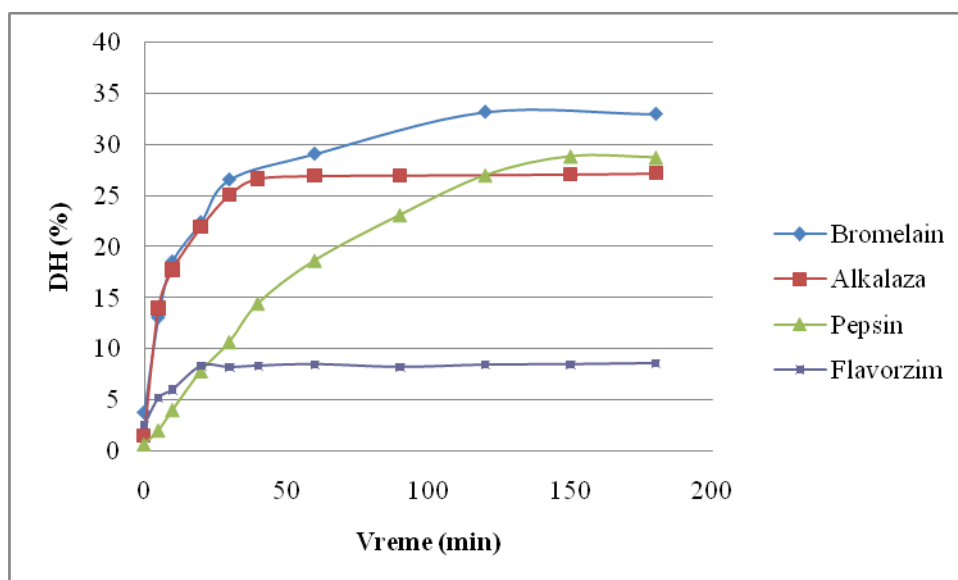
**Tabela 8.** Poređenje predviđene i eksperimentalne vrednosti rastvorljivosti kukurbitina dobijenih pri optimalnim uslovima.

Procesni parametri	Optimalne vrednosti	
pH vrednost	7.69	
Koncentracija NaCl (%)	4.07	
Temperatura (°C)	54	
Odziv	Predviđena vrednost	Eksperimentalna vrednost
Rastvorljivost proteina (mg/ml)	9.091	9.11 ± 0.05

Da bi se proverila predvidljivost jednačine i da bi se dokazalo da su ovi uslovi optimalni za postizanje maksimalne rastvorljivosti, izveden je dodatni eksperiment pri tim vrednostima procesnih parametara. Dobijena eksperimentalna vrednost za odziv slaže se sa predviđenom vrednošću (visok stepen slaganja) što je i prikazano u Tabeli 8. Na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu kao i sličnih rezultata, ranije objavljenih u literaturi (Quanhong i Caili, 2004; Mizubiti i sar., 2000), može se sa sigurnošću tvrditi da metoda odzivnih površina predstavlja efikasan način za optimizaciju uslova ekstrakcije i maksimalne rastvorljivosti proteina.

#### 4.4. Enzimski hidroliza kukurbitina

Četiri različite, komercijalno dostupne proteaze, koje se koriste u prehrambenoj industriji (engl. food-grade), primenjene su u procesu hidrolize kukurbitina. Izabran je jedan enzimski kompleks egzo- i endo-proteaze (flavorzim) i tri endo-proteaze (alkalaze, bromelain i pepsin), od kojih je bromelain poreklom iz biljnog tkiva, pepsin životinjskog, a alkalaza mikrobnog porekla. Progresivne krive hidrolize kukurbitina, primenom navedenih enzima, praćene preko promene vrednosti DH tokom vremena enzimske reakcije, od 180 minuta, prikazane su na Slici 17.



**Slika 17.** Vremenski tok enzimske hidrolize kukurbitina primenom različitih proteaza, inicijalni E/S odnos 0.02g/1g. Reakcioni uslovi, za alkalaze: pH 8.0, 50°C, NaCl koncentracija 40mg/ml; za flavorzim: pH 7.0, 50°C, NaCl koncentracija 40mg/ml; za bromelain: pH 8.0, 50°C, NaCl koncentracija 40mg/ml i za pepsin: pH 3.0, 37°C, bez dodatka soli.

Tipične, krive hidrolize dobijene su, gotovo kod svakog enzima: odlikuje ih brzi inicijalni tok, praćen fazom usporavanja i konačno zaravnjenjem toka krive i završetkom reakcije hidrolize. Sličan izgled progresivnih kriva hidrolize publikovali su i drugi autori za hidrolizu proteina soje (Adler-Nissen, 1979), konoplje (Tang i sar. 2009) i pšeničnog glutena (Kong i sar., 2007). Na Slici 17 se vidi da proces hidrolize sa alkalazom, flavorzimom i

bromelainom u prvih 30 minuta ima znatno brži inicijalni tok, a nakon toga usporava, dok je brzina pepsinske hidrolize ujednačena tokom prvih 120 minuta, pa tek nakon tog vremena opada. Znatno više vrednosti DH postignuti su kod hidrolizata dobijenih primenom bromelaina, pepsina i alkalaze (33%, 28.7% i 27.2%, respektivno) od hidrolizata dobijenog primenom flavorzima (8.6%), pri ispitivanim uslovima. Dobijeni niži stepeni hidrolize posledica su niže enzimske aktivnosti flavorzima, kao i činjenice da je ovaj enzim kompleks egzo- i endo- proteaza. Slična zapažanja navode Dong i saradnici (2008) za proteine ribe i Cumby i saradnici (2008) za proteine uljane repice. Iz ovoga se može zaključiti da se hidrolizati različite vrednosti DH mogu dobiti jednostavnim izborom tipa proteaze i vremena hidrolize.

#### **4.4.1. Gel elektroforeza**

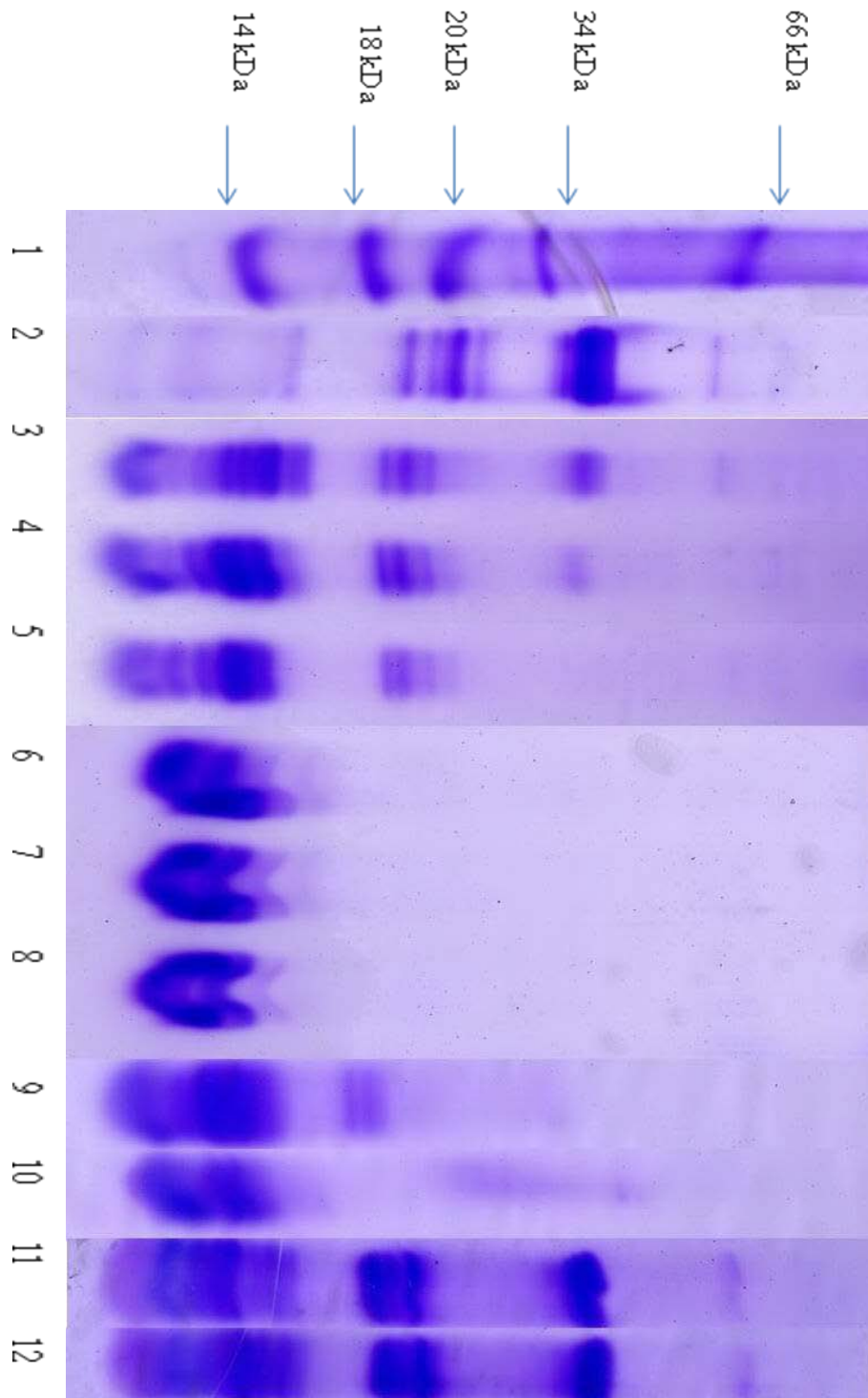
Promene u strukturi kukurbitina tokom procesa enzimske hidrolize praćene su primenom SDS gel elektroforeze u prisustvu  $\beta$ -merkaptetanola. Na Slici 18 prikazani su proteinski profili kukurbitina i njegovih hidrolizata, različitih stepena hidrolize, dobijeni primenom četiri ispitivana enzima: bromelaina, alkalaze, flavorzima i pepsina. Proteinski markeri i vrednost njihovih molekulskih masa prikazani su na liniji 1. Elektroforetogram kukurbitina (linija 2) pokazuje prisustvo dve glavne trake, odnosno dve polipeptidne podjedinice molekulskih masa  $M_r = 33.0$  kDa i  $22.0$  kDa, koje odgovaraju kiselom i baznom polipeptidnom lancu kukurbitina, respektivno. Proteinski profili hidrolizata dobijenih primenom bromelaina, DH vrednosti 10%, 20% i 30%, prikazani su linijama 3, 4 i 5, respektivno. Primećeno je da trake koje predstavljaju kiseli polipeptidni lanac gotovo nestaju već pri stepenu hidrolize od 10% (linija 3), dok bazna podjedinica nestaje tek kod hidrolizata stepena hidrolize 30% (linija 5). Ovo potvrđuje činjenicu da su kisele podjedinice uglavnom locirane na površini proteinske molekule, dok su bazne obično zavučene u unutrašnjost molekule (Plietz i sar., 1984). Slični rezultati su objavljeni izučavanjem procesa hidrolize drugih biljnih proteina (Guan i sar., 2007; Schwenke, 2001). Proces hidrolize bromelainom vodi do nastajanja peptida molekulskih masa  $M_r < 18.0$  kDa i vidi se da udeo veoma malih peptida, rastvorljivih u TCA, raste sa dužinom trajanja procesa hidrolize.

Proteinski profili pepsinskih hidrolizata prikazani su linijama 6, 7 i 8. Sve proteinske podjedinice su hidrolizovane u peptidne fragmente molekulskih masa ispod 14 kDa već pri DH vrednosti od 10%. Ovo je objašnjeno činjenicom da se pri niskim vrednostima pH (pH na



kojima se izvodi proces hidrolize pepsinom, 1.5-3.0), svi proteini razlažu, pa čak imaju i razmotanu strukturu, što olakšava njihovu hidrolizu pepsinom (Tang i sar., 2009).

Tretman alkalazom (linije 9 i 10) dovodi do sličnih proteinskih profila kao u slučaju bromelainskih hidrolizata. Kisele podjedinice se lakše hidrolizuju (već nakon 10 minuta), za razliku od baznih. Hidrolizati nastali primenom flavourzima, DH vrednosti 6% i 9% prikazani su linijama 11 i 12. Proces hidrolize kukurbitina flavorzimom limitiran je do određenog stepena hidrolize, jer treba imati u vidu da flavorzim za razliku od prethodnih enzima, sadrži egzoproteaze. Slični rezultati su reportovani za hidrolizate edestina, globulina semena konoplje, ovim enzimom (Tang i sar., 2009).



**Slika 18.** Elektroforetski profili kukurbitina i njegovih hidrolizata. Markeri molekulskih masa 1; kukurbitin 2; hidrolizati bromelaina: DH 10% 3; DH 20% 4; DH 30% 5; hidrolizati pepsina: DH 10% 6; DH 20% 7; DH 30% 8; hidrolizati alkalaze: DH 15% 9; DH 30% 10; hidrolizati flavorzima: DH 6% 11; DH 9% 12.

#### 4.4.2. Optimizacija i kontrola procesa enzimske hidrolize kukurbitina

Funkcionalne osobine proteinskih hidrolizata značajno se razlikuju u zavisnosti od primenjenog enzima i vrednosti DH (Surowka i sar., 2004a; Surowka i sar., 2004b; Jung i sar., 2005), pa prema tome, sam proces enzimske hidrolize mora biti kontrolisan i izvodi se pri tačno određenim reakcionim uslovima (Chabanon i sar., 2007; Zhu i sar., 2006). DH je osnovni parametar koji definiše produkte hidrolize, i kao što je ranije navedeno, na DH imaju uticaj specifična aktivnost proteaze, fizičko-hemijske karakteristike proteinskog supstrata kao i reakcioni uslovi (Adler-Nissen, 1982). Da bi se optimizirao proces enzimske hidrolize proteina i produkovali hidrolizati željenih vrednosti DH, metoda odzivnih površina može biti veoma uspešna tehnika za te svrhe (Bhaskar i sar., 2008; Cao i sar., 2008; Guerard i sar., 2007; Xia i sar., 2007).

Iz prethodnog eksperimenta, u kome je izveden skrining aktivnosti četiri enzima, vidi se da bromelain ima najveću efikasnost, pri ispitivanim uslovima hidrolize, u pogledu postizanja najveće vrednosti DH kukurbitina. Zbog toga je izabran ovaj enzim u cilju ispitivanja uticaja procesnih parametara na vrednost DH kukurbitina. Takođe, primenom RSM, definisani su optimalni uslovi za postizanje maksimalne vrednosti DH kukurbitina. Varijabile koje su uključene u proces optimizacije su E/S odnos i vreme hidrolize. Koncentracija enzima je, svakako, najvažniji faktor koji ima uticaj na proces enzimske hidrolize, a takođe ima veliki uticaj na troškove proizvodnje. Primenjen je „full-factorial“ eksperimentalni plan sa dva faktora na pet nivoa (Tabela 9.).

**Tabela 9.** Procesni parametri i njihovi nivoi korišćeni u metodi odzivnih površina za optimizaciju procesa enzimske hidrolize kukurbitina

Promenljive	Nivoi				
	-2	-1	0	1	2
E/S odnos (g/g), ( $x_1$ )	0.004	0.008	0.012	0.016	0.020
Vreme hidrolize (min), ( $x_2$ )	5	20	35	50	65

Tabela 10 prikazuje set eksperimenata sa postignutim DH vrednostima pri ispitivanim kombinacijama procenih parametara. Rezultati dobijeni iz 25 eksperimenata su korišćeni za optimizaciju procesnih parametara hidrolize kukurbitina bromelainom.

**Tabela 10.** Faktorski plan sa eksperimentalnim vrednostima DH u hidrolizi kukurbitina sa bromelainom.

Broj eksperimenata	Nezavisni parametri		DH (%)
	(x <sub>1</sub> )	(x <sub>2</sub> )	
1	-2	-2	12.30
2	-2	-1	16.89
3	-2	0	19.00
4	-2	1	18.02
5	-2	2	17.66
6	-1	-2	12.09
7	-1	-1	26,45
8	-1	0	29.01
9	-1	1	29.11
10	-1	2	28.22
11	0	-2	14.72
12	0	-1	35.63
13	0	0	39.00
14	0	1	35.00
15	0	2	28.01
16	1	-2	14.23
17	1	-1	37.92
18	1	0	35.50
19	1	1	33.08
20	1	2	32.90
21	2	-2	18.03
22	2	-1	22.02
23	2	0	21.85
24	2	1	22.67
25	2	2	22.08

Sledeća jednačina (20) predstavlja empirijsku zavisnost između vrednosti DH (Y) i procesnih parametara (u kodiranim vrednostima):

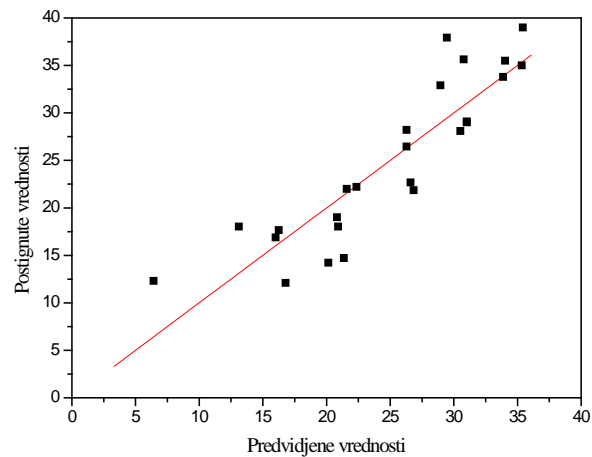
$$Y = 35.429 + 1.50544x_1 + 2.2874x_2 - 2.8977x_1^2 - 2.3716x_2^2 - 0.08434x_1x_2 \quad (20)$$

Regresioni koeficijenti dobijeni primenom metode najmanjih kvadrata (engl. Least square methods), korišćeni za predviđanje kvadratnog polinomnog modela za stepen hidrolize, kao odziv, prikazani su u Tabeli 11. Analizom varijanse modelovanog odziva, na osnovu  $t$ - i  $p$ -vrednosti može se zaključiti da model, sa stanovišta statistike, daje dobro predviđanje eksperimentalnih podataka. Visoke vrednosti koeficijenta korelacije ( $R = 0.899$ ) i koeficijenta determinacije ( $R^2 = 0.791$ ) ukazuju na adekvatno fitovanje eksperimentalnih rezultata polinomom drugog reda. Prema rezultatima iz Tabele 11 može se zaključiti da promenljiva koja ima statistički najveći značaj ( $p < 0.05$ ) je linearni član vremena ( $x_2$ ), praćen kvadratnim članom vremena ( $x_2^2$ ) i kvadratnim članom E/S odnosa ( $x_1^2$ ).

**Tabela 11.** Regresioni koeficijenti u modelu enzimske hidrolize kukurbitina bromelainom

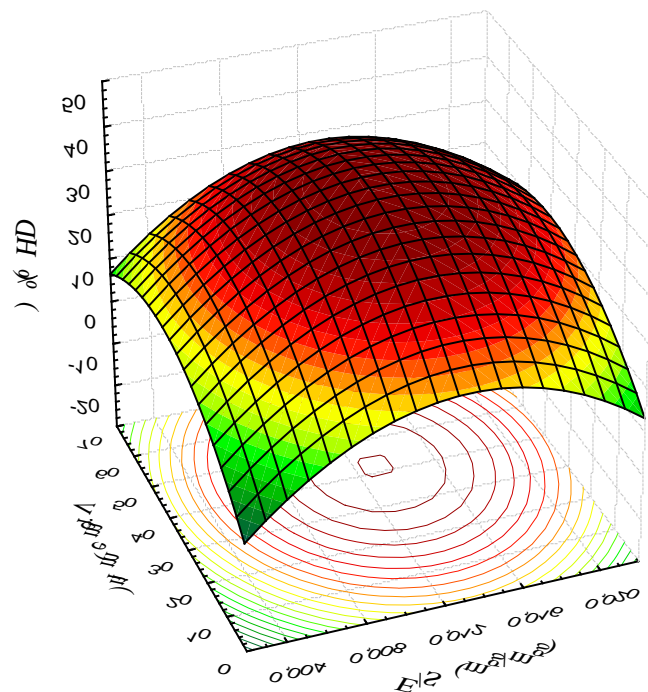
Parametri	Regresioni koeficijenti	Standardna devijacija	$t$ -vrednost	$p$ - vrednost
$b_0$	35.429	1.705	20.778	0.000
$b_1$	1.505	0.613	2.452	0.02400
$b_2$	-2.897	0.518	-5.581	0.00002
$b_3$	2.287	0.613	3.726	0.00143
$b_4$	-2.371	0.518	-4.571	0.00021
$b_5$	-0.084	0.434	-0.194	0.84801
$F$ -value	14.407			
$p$ -value	0,000007			
$R$	0,889530			
$R^2$	0,791263			

Grafik zavisnosti postignutih vrednosti eksperimentalno i vrednosti dobijenih na osnovu jednačine (engl. Parity plot) prikazan je na Slici 19. "Parity plot" pokazuje linearnu korelaciju između predviđenih i eksperimentalno određenih vrednosti DH kukurbitina u procesu hidrolize bromelainom.



**Slika 19.** „Parity plot“ postignutih i predviđenih vrednosti DH kukurbitina u procesu hidrolize bromelainom

Trodimenzionalni grafik odzivne površine prikazan na Slici 20 ilustruje efekte nezavisnih promenljivih na vrednost DH.



**Slika 20.** 3D grafik odzivne površine zavisnosti vrednosti DH od E/S odnosa i vremena hidrolize kukurbitina promenom bromelaina.

Sa Slike 20 se vidi da dobijena funkcija odzivne površine ima vrednost maksimuma u okviru opsega eksperimentalnih vrednosti nezavisnih promenljivih. Precizne koordinate maksimuma funkcije se dobijaju analitičkom procedurom, tkz. definisanja neophodnih uslova. Kada se parcijalni izvodi regresione jednačine (20) izjednače sa nulom dobija se sledeći sistem jednačina (21):

$$\begin{aligned}\frac{\partial Y}{\partial x_1} &= 1.50544 - 2 \cdot 2.8977x_1 - 0.08434x_2 = 0 \\ \frac{\partial Y}{\partial x_2} &= 2.2874 - 2 \cdot 2.3716x_2 - 0.08434x_1 = 0\end{aligned}\quad (21)$$

Kada se reši sistem jednačina (21) dobijaju se sledeći rezultati za kodirane vrednosti parametara procesa:  $x_1=0.2528$  i  $x_2=0.4777$ . Realne vrednosti nezavisnih promenljivih pri kojima se postiže maksimalna vrednost DH od 36.17% prikazane su u Tabeli (12).

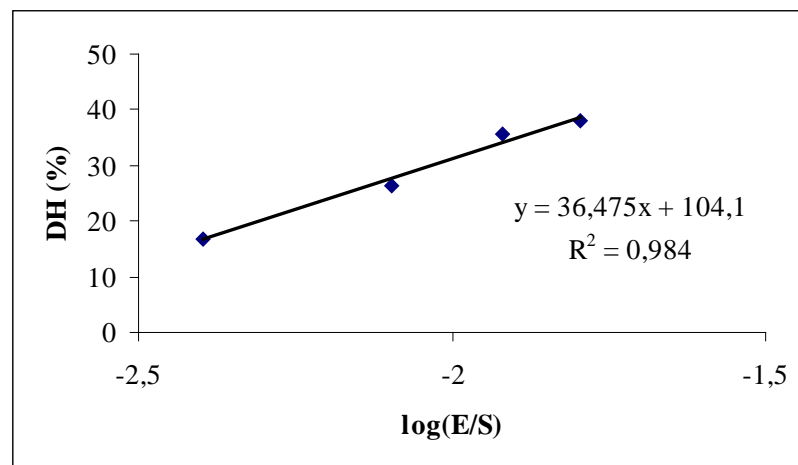
**Tabela 12.** Optimalni uslovi hidrolize kukurbitina bromelainom dobijeni primenom metode odzivnih površina.

Parametri hidrolize	Optimalne vrednosti
E/S (w/w)	0.0132
Vreme (min)	42
Predviđena vrednost DH (%)	36.17
Eksperimentalna vrednost DH (%)	34.25±0.6 %

Da bi se dokazalo da su ovi uslovi optimalni za postizanje maksimalnog DH, izveden je eksperiment pri tim vrednostima procesnih parametara. Dobijena eksperimentalna vrednost za odziv se slaže sa predviđenom vrednošću (visok stepen slaganja) kako je i prikazano u Tabeli 12.

Prednost primene RSM nije samo u optimizaciji procesa hidrolize. Takođe, ova metoda pokazala se kao korisna tehnika za definisanje tačnih vrednosti procesnih parametara neophodnih za dobijanje hidrolizata željenih vrednosti DH. Odnos između vrednosti DH i procesnih parametara najbolje se može sagledati sa konturnog grafa, (Slika20), odakle mogu biti lako izabrani uslovi hidrolize za dobijanje hidrolizata željene vrednosti DH.

Sa druge strane, neki autori predlažu drugačiji način definisanja zavisnosti između procesnih parametara i vrednosti DH. Logaritamsko-linearni odnos DH i E/S odnosa za određeno vreme reakcije, takođe, predstavlja uspešan način kontrole procesa hidrolize (Chabanon i sar., 2007). Ova zavisnost je predstavljena grafikom na Slici 21, za rezultate dobijene nakon 20 minuta trajanja procesa hidrolize. I ova metoda se pokazala kao jednostavna tehnika za određivanje vrednosti procesnih parametara radi postizanja željenog DH.



**Slika 21.** Semi log-linearni odnos između vrednosti DH, postignutog nakon 20 minuta procesa hidrolize kukurbitina primenom bromelaina, i E/S odnosa.



### **4.4.3. Funkcionalne osobine hidrolizata kukurbitina**

Proteinski hidrolizati, prema navodima iz literature, imaju značajno unapređene funkcionalne osobine u odnosu na izvorne proteine. Rastvorljivost proteina raste sa porastom vrednosti DH u širokom opsegu pH (Govindaraju i Srinivas, 2006). Rastvorljivost ima značajan uticaj na ostale funkcionalne osobine proteina, kao što su emulzione osobine i sposobnost formiranja pene (Kristinsson i Rasco, 2000). Generalno, od vrednosti DH zavise funkcionalne osobine hidrolizata, tako da hidrolizati sa nižim ili umerenim vrednostima DH pokazuju znatno bolje funkcionalne osobine od visokohidrolizovanih (Chabanon et al. 2007).

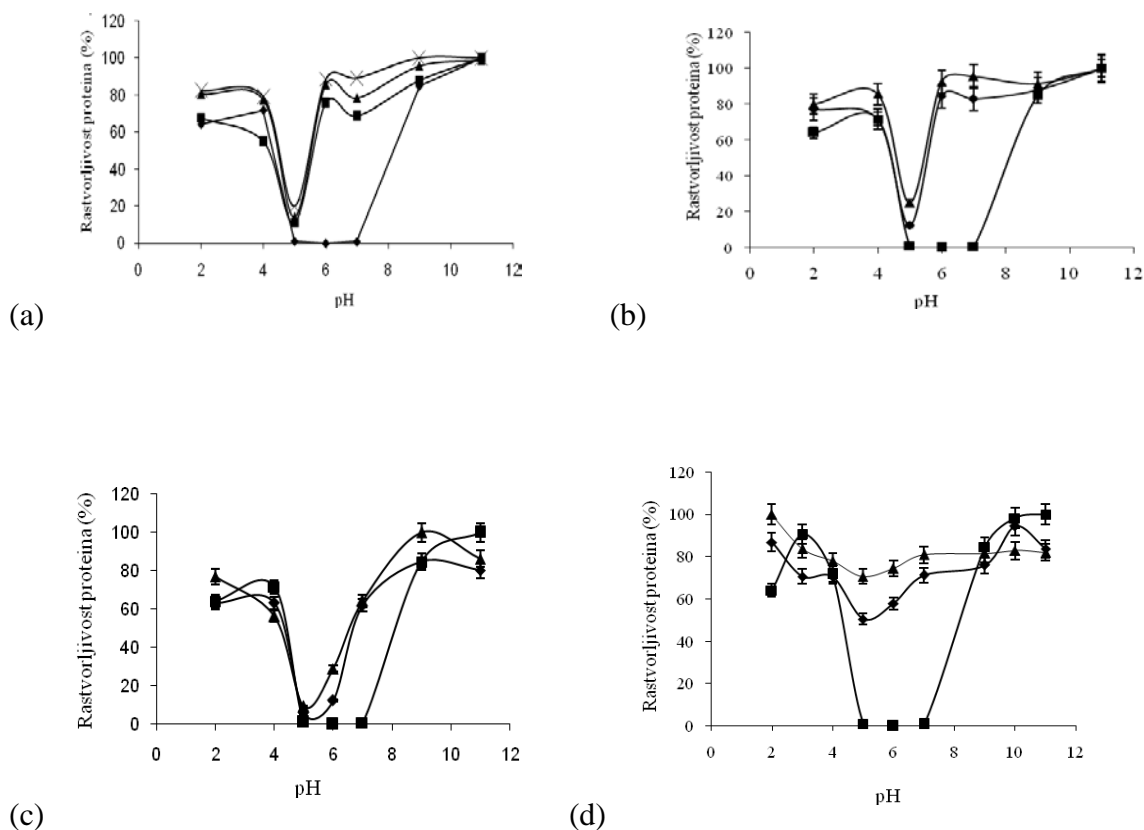
Iz tih razloga, u ovom radu, kontrolisan je proces enzimske hidrolize kukurbitina u cilju dobijanja hidrolizata sa vrednostima DH nižim od maksimalnih, primenom četiri proteaze. Ispitane su i međusobno poređene funkcionalne osobine dobijenih hidrolizata, kao što su rastvorljivost, emulzione osobine, sposobnost formiranja pene, adsorpcija ulja.

#### *4.4.3.1. Rastvorljivost*

Rastvorljivost je jedna od najznačajnijih karakteristika proteina zbog svog uticaja na sve ostale funkcionalne osobine. Na Slici 22 prikazani su pH profili rastvorljivosti proteinskih hidrolizata kukurbitina različitih vrednosti DH, dobijeni primenom četiri ispitivana enzima. Za razliku od kukurbitina, kod koga je kriva rastvorljivosti U-oblika (Slika 14) i koji ima ekstremno malu rastvorljivost u pH opsegu od 5.0-7.0 (oko 0.05 mg/ml), proteinski hidrolizati imaju visoku rastvorljivost na gotovo svim vrednostima pH. Enzimska hidroliza kukurbitina dovodi do neznatnog povećanje rastvorljivosti na ekstremno kiselim i baznim pH vrednostima, dok je u opsegu pH vrednosti od 6.0-8.0 ovo povećanje izrazito kod svih ispitivanih hidrolizata.

Generalno, degradacija proteina na manje peptide dovodi do nastajanja produkata veće rastvorljivosti (Gbogouri i sar., 2004; Chobert i sar., 1988). Povećanje rastvorljivosti proteinskih hidrolizata objašnjava se većim udelom slobodnih aminokiselina i peptida koji nastaju tokom procesa hidrolize, kao i porastom jonizujućih amino i karboksilnih grupa koje povećavaju hidrolfilni karakter hidrolizata.

Primenom bromelaina i alkalaze značajno se povećava rastvorljivost kukurbitina na vrednostima pH 6.0-8.0, dok se na pH 5.0 rastvorljivost kukurbitina primenom ovih enzima povećava svega 12 % (Slika 22 a i b).



**Slika 22.** pH profili rastvorljivosti kukurbitina i njegovih hidrolizata različitih vrednosti DH dobijenih primenom (a) bromelaina, (b) alkalaze, (c) flavorzima i (d) pepsina. (a): kukurbitin (◆), DH 10 % (■), DH 20% (▲) i DH 30 % (x); (b): kukurbitin (■), DH 30 % (▲) i DH 15 % (◆); (c): kukurbitin (■), DH 9 % (▲) i DH 6 % (◆); (d): kukurbitin (■), DH 30% (▲) i DH 15% (◆).

U slučaju primene flavorzima, u procesu hidrolize kukurbitina, (Slika 22c) rastvorljivost je umereno poboljšana u opsegu pH 6.0-8.0. Najniža rastvorljivost hidrolizata, takođe, je određena na pH 5.0. pH profili rastvorljivosti hidrolizata dobijenih primenom pepsina razlikuju se od hidrolizata ostala tri enzima (Slika 22d). Dolazi do eliminacije izoelektrične oblasti iz krive rastvorljivosti kukurbitina. Rastvorljivost ovih hidrolizata je gotovo konstantna u celom opsegu pH vrednosti (2.0-11.0) i kreće se u opsegu 60-90%. Produženje procesa hidrolize (povećanje vrednosti DH) odražava se i na povećanje rastvorljivosti dobijenih hidrolizata kod svih ispitivanih enzima. Slični rezultati dobijeni su hidrolizom proteina ova

primenom tripsina (Guan i sar., 2007), a takođe hidroliza arašina alkalazom i papainom dovodi do značajnog povećanja rastvorljivosti proteina naročito u oblasti pH bliskih izolektričnoj tački proteina (Govindarju i sar., 2006). Prema Muhmoud (1994) i Frokjaer-u (1994), hidrolizati sa visokom rastvorljivošću u širokom opsegu pH vrednosti, naročito u kiseloj oblasti pH, našli su primenu kao dodaci u voćnim sokovima i kiselim napicima radi povećanja nutritivnog kvaliteta proizvoda.

#### 4.4.3.2. Sposobnost formiranja emulzije

Emulzione osobine hidrolizata kukurbitina dobijene primenom četiri različite proteaze, merene kao EAI i ESI prikazane su u Tabeli 13. Hidrolizati različitih vrednosti DH uzeti su za razmatranje. Generalno, poboljšanje emulzionih osobina proteina postiže se procesom limitirane hidrolize, pri umerenim i nižim vrednostima DH, dok produženjem procesa hidrolize dolazi do smanjenja vrednosti emulzionih osobina proteina. Ovo je posledica toga što mali peptidi migriraju brže i adsorbuju se na graničnoj površini faza, ali imaju manju efikasnost u redukciji međufaznog napona jer nemaju sposobnost stabilizovanja emulzija, kao veliki peptidi (Gbogouri i sar., 2004; Rahali i sar., 2000).

Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa prethodnim tvrdnjama. Hidrolizati kukurbitina, dobijeni dejstvom svih ispitivanih enzima, koji imaju DH niži od 15% pokazuju više vrednosti EAI i ESI u odnosu na nativni protein-kukurbitin. Kod hidrolizata sa vrednostima DH preko 15% dolazi čak i do opadanja vrednosti emulzionih parametara u odnosu na kukurbitin. Najviše vrednosti za EAI i ESI ( $0.77 A_{500nm}$  and 87.5min, respektivno) postignute su kod hidrolizata vrednosti DH 9.2 % dobijenog primenom flavorzima. Hidrolizat dobijen dejstvom bromelaina (DH = 10%) odlikuje se, takođe, relativno visokom vrednošću EAI ( $0.632 A_{500nm}$ ).

Poređenjem sa rezultatima iz literature dobijenim kod drugih proteina, vrednost za EAI u ovom opsegu imaju hidrolizati: pšeničnog glutena, globulina uljane repice (Chabanon i sar., 2007), kao i proteinskog izolata semena kikirikija (Wu et al., 2009). Trend smanjivanja emulzionih osobina sa porastom vrednosti DH zapazili su i Kristinsson i Rasco (2000) kod hidrolizata proteina ribe.

**Tabela 13.** Emulzione osobine kukurbitina i njegovih hidrolizata različitih vrednosti DH dobijenih primenom bromelaina, alkalaze, flavorzima i pepsina

Enzim	DH (%)	EAI ( $A_{500nm}$ )	ESI (min)
Bromelain	10	0.632±0.02	44.2±0.62
	20	0.229±0.01	24.1±0.41
	30	0.310±0.01	22.1±0.21
Alkalaza	15	0.452±0.02	45.3±0.62
	30	0.195±0.01	33.1±0.15
Flavorzim	6	0.621±0.04	62.1±0.33
	9	0.777±0.03	87.5±0.36
Pepsin	15	0.523±0.02	40.5±0.41
	30	0.272±0.02	28.3±0.62
Kukurbitin	-	0.334±0.02	28.2±0.51

#### 4.4.3.3. Adsorpcija ulja

Proces enzimske hidrolize dovodi do otkrivanja hidrofobnih grupa na površini, koje su se uglavnom nalaze u jezgru molekula proteina. Iz tih razloga proteinski hidrolizati se odlikuju većom sposobnošću adsorpcije ulja u odnosu na nativni protein (Mahajan i Dua, 1998). U ovom radu, svi ispitivani hidrolizati kukurbitina, dobijeni primenom četiri proteaze, imaju unapređena svojstva adsorpcije ulja u odnosu na kukurbitin (Tabela 14). Iz rezultata se može zaključiti da ne postoji korelacija između vrednosti adsorpcije ulja i DH. Najveću vrednost adsorpcije ulja ( $2.545 \pm 0.01$  g/g<sub>s.m</sub>) ima hidrolizat dobijen dejstvom pepsin sa vrednošću DH od 20%, što je trostruko veće u odnosu na vrednost adsorpcije ulja kukurbitina ( $0.767 \pm 0.02$ ). Najnižu vrednost ( $1.084 \pm 0.03$  g/g<sub>s.m</sub>) ima hidrolizat sa DH= 20 % dobijen dejstvom bromelaina.

**Tabela 14.** Adsorpcija ulja kukurbitina i njegovih hidrolizata različitih vrednosti DH dobijenih primenom bromelaina, alkalaze, flavorzima i pepsina

Enzim	DH (%)	Adsorpcija ulja (g/g <sub>s.m.</sub> )
Bromelain	10	1.298 ± 0.05
	20	1.084 ± 0.03
	30	1.112 ± 0.05
Alkalaza	15	1.864±0.03
	30	1.987±0.01
Flavorzim	6	1.1735±0.02
	9	1.452±0.01
Pepsin	15	2.545±0.01
	30	1.921±0.02
Kukurbitin	-	0.767±0.02

#### 4.4.3.4. Sposobnost formiranja pene

Osobine molekula proteina koje su poželjne za formiranje pene slične su onima koje su neophodne za formiranje emulzije. Faktori koji se smatraju neophodnim za formiranje pene su rastvorljivost, fleksibilnost segmenata koji omogućavaju odmotavanje na međufaznoj površini, prisustvo naelektrisanja i polarnih grupa radi prevencije približavanja mehura gasne faze kao i sterna efekti. Proteini u disperzijama prouzrokuju smanjenje površinskog napona na garnici faza tečnost-gas što omogućuje lakše formiranje pene (Surowka i sar., 2004b). U ovom radu osobine pene su merene i izražene kao kapacitet pene („Foam capacity“ FC) i stabilnost pene („Foam stability“ FS). Rezultati dobijeni za FC prikazani su u Tabeli 15. Značajan porast vrednosti FC postignut je kod svih izučavanih hidrolizata u odnosu na kukurbitin.

Ustanovljeno je da vrednost DH kao i vrsta enzima imaju značajan uticaj na FC. U slučaju hidrolizata dobijenih primenom bromelaina, FC raste sa porastom DH do 20%, postiže maksimalnu vrednost od 150.3±3.66 %, a zatim sa daljim porastom vrednosti DH opada. Nasuprot tome, u slučaju ostala tri ispitivana enzima sa porastom DH vrednosti, raste i FC. Maksimalnu vrednost za FC (242±3.21 %) ima hidrolizat dobijen primenom alkalaze DH

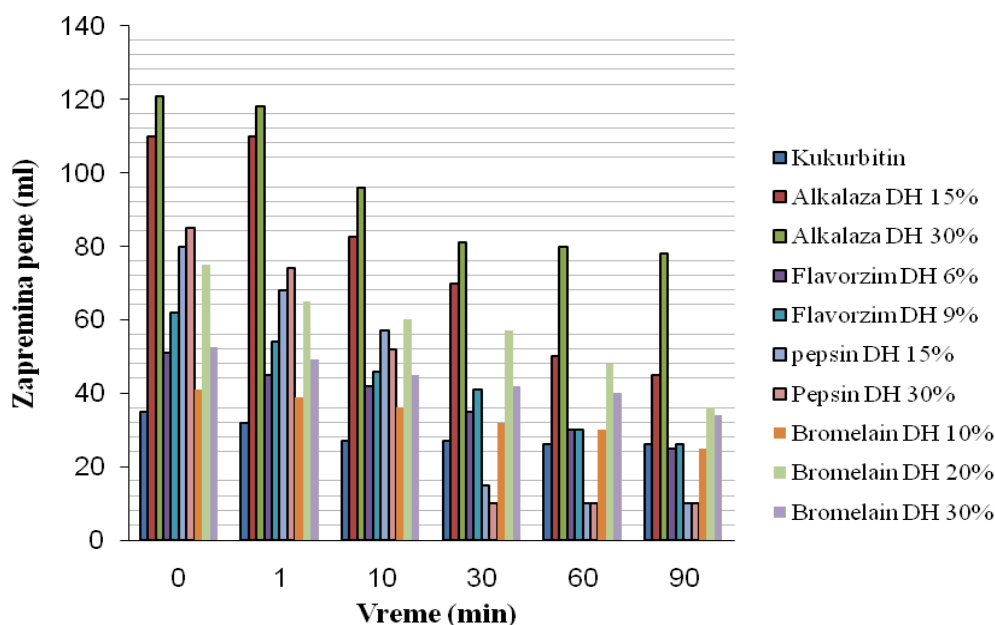
vrednosti od 30%. Kao što je ranije i istaknuto, rastvorljivost proteina ima značajan uticaj na sklonost proteina ka formiranju pene. U ovom radu dokazano je da alkalaze proizvode hidrolizate sa najvišim vrednostima za osobine pene i ujedno ovi hidrolizati pokazuju najveću rastvorljivost, na ispitivanom pH.

**Tabela 15.** Kapacitet pene kukurbitina i njegovih hidrolizata različitih vrednosti DH dobijenih primenom bromelaina, alkalaze, flavorzima i pepsina

Enzim	DH (%)	FC (%)
Bromelain	10	82.3 ± 3.12
	20	150.0 ± 3.66
	30	105.0 ± 2.27
Alkalaza	15	220±3.23
	30	242±3.21
Flavorzim	6	102±4.23
	9	124±3.55
Pepsin	15	160±2.55
	30	170±3.66
Kukurbitin	-	70±2.11

Poređenjem sa podacima iz literature može se zaključiti da vrednosti za FC hidrolizata kukurbitina su više od ovih vrednosti kod hidrolizata globulina iz drugih biljnih izvora (Vioque i sar., 2000), zatim proteina ribe (Gimenez, i sar., 2009; Klompong i sar., 2007) i pšeničnog glutena (Kong i sar., 2007).

FS kukurbitina i njegovih hidrolizata prikazane su na Slici 23. Hidrolizati dobijeni dejstvom alkalaza pokazuju superionu stabilnost pene u poređenju sa ostalim hidrolizatima kukurbitina. Najstabilnija pena se postiže kod hidrolizata dobijenog dejstvom alkalaze (DH=30%), zadržavajući 55 % inicijalne zapremine pene nakon 60 minuta perioda mirovanja.

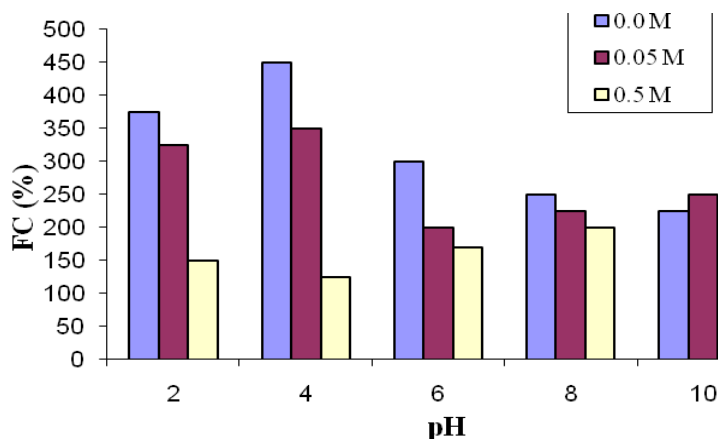


**Slika 23.** Stabilnost pene kukurbitina i njegovih hidrolizata različitih vrednosti DH dobijenih primenom bromelaina, alkalaze, flavorzima i pepsina

Iz prethodnog može se jasno videti da hidrolizat dobijen dejstvom alkalaze sa DH vrednošću od 30% ima najveće vrednosti za FC i FS. Stoga, dalja ispitivanja karakteristika pene izvedena su na ovom proteinskom hidrolizatu.

Od fizičko-hemijskih faktora koji imaju značajan uticaj na funkcionalne osobine proteina, pa samim tim i osobine pene, su svakako pH i jonska jačina. Zbog toga ispitan je uticaj pH i jonske jačine rastvora na proces formiranja pene hidrolizata kukurbitina. Na Slici 24 prikazane su vrednosti FC hidrolizata kao funkcije pH vrednosti pri različitim jonskim jačinama rastvora (0.0, 0.05 i 0.5 mol/l). Najviša vrednost FC pri jonskoj jačini 0.0 mol/l postignuta je na pH 4.0, a najniža na pH 10. Generalno, u rastvorima bez dodatka soli, FC je značajno veći u kiseljoj sredini nego u neutralnoj i baznoj sredini. Ovo je suprotno tvrđenju Aluko i Yada (1993) koji su ispitivali sposobnost formiranja pene hidrolizata globulina graška, kod koga dolazi do povećanja vrednosti FC sa povećanjem pH i jonske jačine u rastvoru.

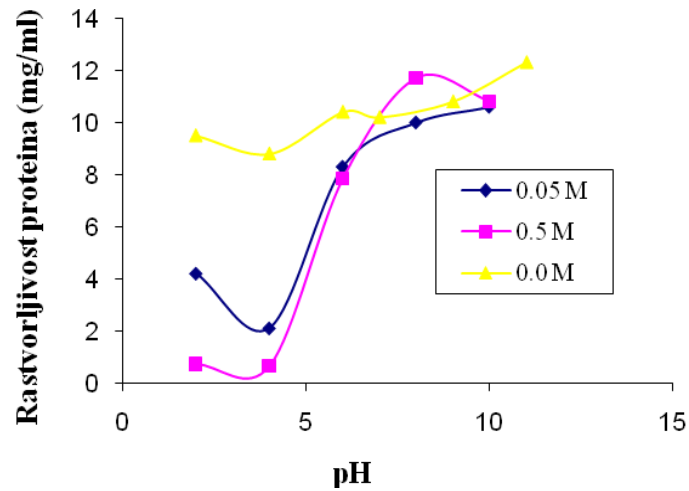
Uticaj jonske jačine na vrednost FC različiti je pri različitim pH vrednostima (Slika 24). Jonska jačina nema značajan uticaj ( $p < 0.05$ ) na vrednost FC na pH vrednostima 8.0 i 10.0, dok značajno ( $p > 0.05$ ) smanjenje vrednosti FC sa povećanjem jonske jačine se zapaža na pH vrednostima od 2.0-6.0.



**Slika 24.** Uticaj pH vrednosti i jonske jačine rastvora na kapacitet pene hidrolizata kukurbitina (DH =30%) dobijenog dejstvom alkalaze

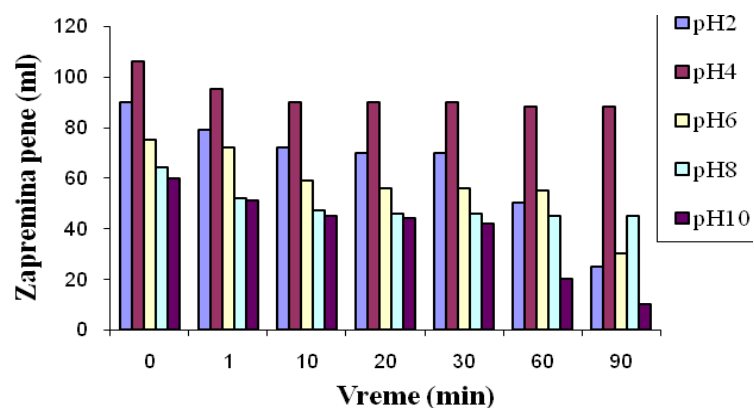
Ovakav uticaj jonske jačine na vrednosti FC može biti objašnjen promenama u rastvorljivosti hidrolizata pod uticajem promena u jonskoj jačini. Na Slici 25 prikazane su pH profili rastvorljivosti hidrolizata pri različitim vrednostima koncentracije soli. Može se zaključiti da pH i jonska jačina izazivaju iste promene u rastvorljivosti i vrednosti FC. Značajan uticaj jonska jačina ima na rastvorljivost proteinskog hidrolizata samo u kiselom području, dok u neutralnoj i alkalnoj sredini ovaj uticaj gotovo da i nema značaj. Ovi rezultati potvrđuju činjenicu da postoji pozitivna korelacija u promenama vrednosti FC i rastvorljivosti. Do sličnog zaključka došli su i Arogundade i saradnici (2006) izučavajući funkcionalne osobine proteinskog izolata semena boba.



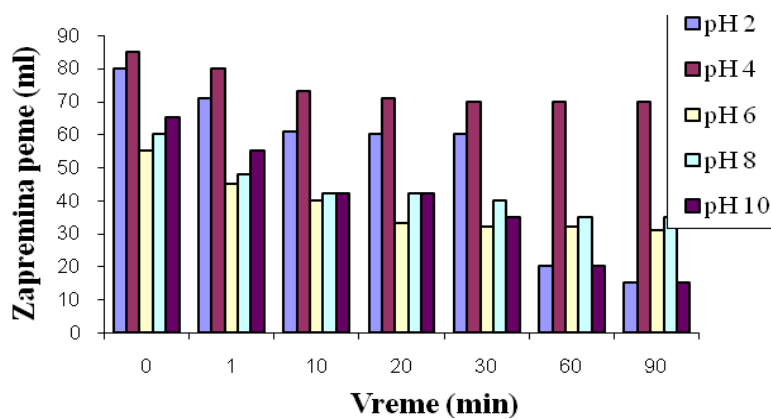


**Slika 25.** Uticaj pH vrednosti i jonske jačine na rastvorljivost hidrolizata kukurbitina (DH 30%) dobijenog primenom alkalaze.

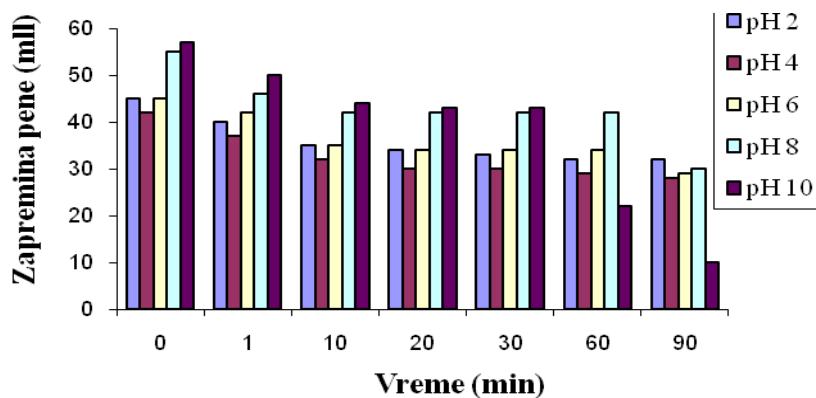
Uticaj pH vrednosti na FS pri različitim vrednostima koncentracije soli prikazan je na Slici 26. Može se zaključiti da pri svim ispitivanim vrednostima koncentracije soli FS je najveća na pH 4.0. Ovaj podatak je od izuzetnog značaja zbog mogućnosti primene ispitivanih hidrolizata u prehrambenoj industriji, jer činjenica je da mnoštvo prehrambenih proizvoda ima pH vrednost blisku pH 4.0. Dalje, slično kao i za FC, porastom jonske jačine raste FS u neutralnim i baznim rastvorima, dok u kiseljoj sredini FS je veća u rastvorima bez dodatka soli.



(a)



(b)



(c)

**Slika 26.** Stabilnost pene hidrolizata kukurbitina (DH 30%) dobijenog primenom alkalaze u funkciji pH vrednosti pri različitim koncentracijama NaCl: 0.0M (a); 0.05M (b); 0.5M (c)

#### **4.4.4. Antioksidativno dejstvo hidrolizata kukurbitina**

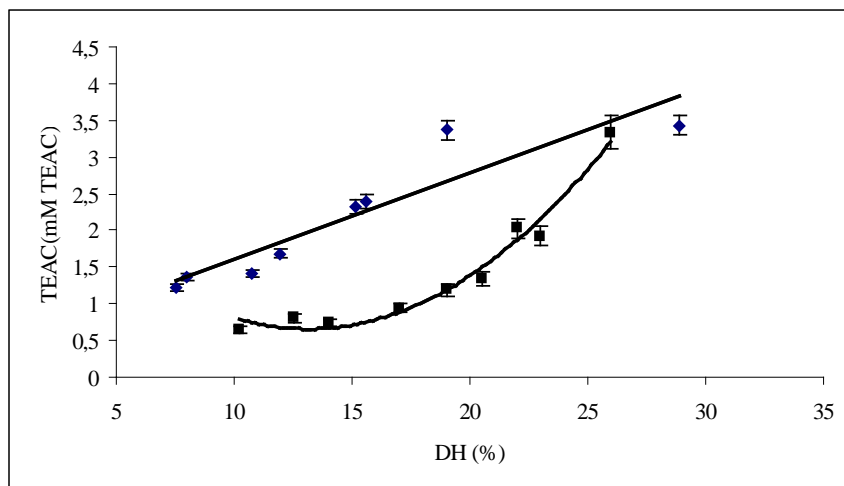
Proteinski hidrolizati, pored toga što imaju unapređene funkcionalne osobine, takođe, mogu istovremeno da pokazuju i antioksidativno delovanje. Dobijanje biološki aktivnih peptida sa antioksidativnim osobinama, iz različitih proteinskih izvora procesom enzimske hidrolize, je od sve većeg naučnog interesa za farmaceutsku i prehrambenu industriju (Hagen i Sandnes, 2004). Takođe, istovremeno posedovanje dobrih funkcionalnih osobina i antioksidativne aktivnosti povećava potencijal proteinskih hidrolizata za primenu u različitim proizvodima.

Stoga, u ovom radu ispitano je antioksidativno dejstvo hidrolizata kukurbitina dobijenih delovanjem tri različite proteaze: alkalaze, pepsina i flavorzima. Primenjena su dva testa u te svrhe: merenje sposobnosti hvatanja ABTS<sup>•+</sup> radikal katjona kao i merenje redukujće moći Fe<sup>3+</sup> (feri) jona. Kao što je poznato, na antioksidativnu aktivnost hidrolizata značajan uticaj ima njihov aminokiselinski sastav, koji zavisi od specifičnosti proteaze (Moure i sar., 2006) kao i vrednost DH (Klompong i sar., 2007; You i sar., 2009). Zbog toga, istraživanja su fokusirana na ispitivanje uticaja vrste enzima i vrednosti DH na antioksidativnu aktivnost hidrolizata kukurbitina.

Aktivnosti hidrolizata kukurbitina prema ABTS<sup>•+</sup> radikal katjonu izražene su u poređenju sa vodorastvorljivim analogom vitamina E (troloksom), preko tzv. Troloks ekvivalenta (TEAC). Na Slici 27 prikazane su aktivnosti hidrolizata, dobijenih dejstvom alkalaze i pepsina, izražene u mM TEAC/mg proteina u funkciji vrednosti DH. Hidrolizati kukurbitina dobijeni delovanjem oba ova enzima, pokazuju značajnu sposobnost hvatanja ABTS<sup>•+</sup> radikal katjona. Vrednost antioksidativne aktivnosti raste sa porastom vrednosti DH. U slučaju pepsina ova zavisnost je linearna, odnosno vrednost TEAC linearno raste sa porašću vrednosti DH, dok hidrolizati alkalaze pokazuju polinomnu zavisnost vrednosti TEAC sa DH. Najveće vrednosti TEAC (u rangu od 3.3 - 3.4 mM TEAC/mg) određene su u hidrolizatima najvećeg DH, dobijenim primenom oba enzima. Ovi rezultati su veoma bliski rezultatima dobijenim za hidrolizat sojinog koncentrata (oko 3 mM TEAC za najviši DH) (Moure i sar., 2006b).

Hidrolizati kukurbitina dobijeni u procesu hidrolize pomoću flavorzima nisu pokazali značajnu antioksidativnu aktivnost, merenu putem oba testa (rezultati nisu prikazani). To može biti posledica malih vrednosti DH dobijenih primenom flavorzima, jer veći DH direktno ukazuje na veću koncentraciju niskomolekularnih peptida, koji su potencijalni nosioci

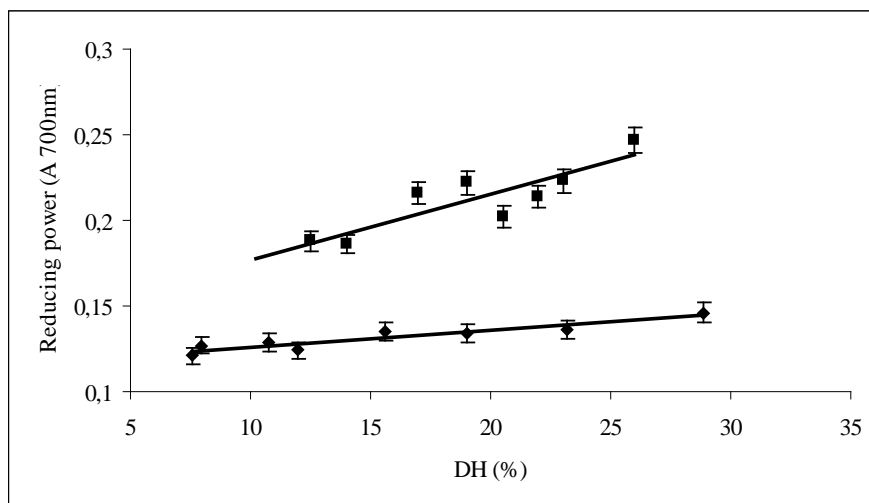
antioksidantnih svojstava. Slično su dokazali i Tang i saradnici (2009) u ispitivanju antioksidativne aktivnosti hidrolizata hemp proteinskog izolata dobijenih dejstvom flavorzima.



**Slika 27.** Troloks ekvivalent (TEAC) hidrolizata kukurbitina dobijenih primenom alkalaze (■) i pepsina (◆) u funkciji vrednosti DH.

Redukujuća moć hidrolizata kukurbitina dobijenih delovanjem alkalaze i pepsina ispitana je na osnovu sposobnosti hidrolizata da redukuju  $Fe^{3+}$  jone. Uticaj vrednosti DH na redukujuću moć hidrolizata kukurbitina prikazan je na Slici 28. Rezultati pokazuju da je redukujuća moć izrazito zavisna od vrste enzima i vrednosti DH hidrolizata. Vrednosti za redukujuću moć u svim hidrolizatima kukurbitina veće su u odnosu na redukujuću moć samog kukurbitina (vrednosti apsorbance na  $\lambda=700nm$  iznosi 0.045). U slučaju hidrolizata alkalaze izraženiji je uticaj DH na vrednost redukujuće moći. Redukujuća moć linearno raste sa porastom DH. Hidrolizat vrednosti DH=26% ima za 30% veću redukujuću moć od hidrolizata koji ima DH=16%. Uticaj vrednosti DH na redukujuću moć reportovano je i kod drugih proteinskih hidrolizata (You i sar., 2009). Kod hidrolizata dobijenih delovanjem pepsina nije toliko izražen uticaj DH vrednosti na redukujuću moć. Dobijene vrednosti apsorbance na  $\lambda=700 nm$  kreću se oko 0.13 i znatno su niže nego u slučaju primene alkalaze. Ovo ukazuje da hidrolizati dobijeni delovanjem alkalaze, verovatno, poseduju više aktivnih aminokiselina ili peptida sposobnih da reaguju sa slobodnim radikalima i formiraju stabilnije produkte. Svakako,

dobijeni rezultati dokazuju da hidrolizati kukurbitina dobijeni dejstvom alkalaze i pepsina imaju poredive vrednosti redukujuće moći sa drugim biljnim hidrolizatima (Zhu i sar., 2006).



**Slika 28.** Redukujuća moć hidrolizata kukurbitina dobijenih primenom alkalaze (■) i pepsina (◆) u funkciji vrednosti DH.

## **4.5. ENZIMSKO UMREŽAVANJE KUKURBITINA**

Poznato je da primena enzima TG za modifikaciju proteina predstavlja atraktivan način za unapređenje funkcionalnih osobina. Za TG je reportovano u literaturi da: poboljšavaju rastvorljivost, želiranje, adsorpciju ulja i vode globulina ovsu (Siu i sar., 2002); takođe povećavaju rastvorljivost glutena (Agyare i sar., 2008) i proteinskog izolata soje (Walsh i sar., 2003).

Određene, željene funkcionalne osobine mogu biti postignute polimerizacijom proteina pomoću TG, ali procesni parametri moraju biti kontrolisani da bi se kao proizvod dobio protein željenih funkcionalnih osobina. (Singh, 1991). Promenljive koje imaju najznačajniji uticaj na enzimsku reakciju su koncentracija enzima, pH, vreme trajanja reakcije, temperatura kao i priroda samog proteinskog supstrata. Kada više faktora, istovremeno, ima uticaj na jednu izlaznu veličinu, tada primena metode odzivnih površina predstavlja efikasan način za definisanje njihovih optimalnih vrednosti (Triveni i sar., 2001).

Stepen umrežavanja ili polimerizacije, DP (eng. „degree of polymerization“) sa jedne strane i efekti umrežavanja proteina, sa druge strane, nisu dovoljno istraženi u literaturi. U ovom radu biće ispitana mogućnost primene kukurbitina kao supstrata u reakciji umrežavanja primenom TG. Cilj ispitivanja je optimizacija reakcionih uslova (E/S odnosa, temperature i vremena) za postizanje maksimalnog DP kukurbitina primenom TG.

### **4.5.1. Modelovanje procesa enzimskog umrežavanja kukurbitina**

U preliminarnim ispitivanjima utvrđeno je da procesni parametri kao što su: vreme, količina enzima i temperatura imaju značajan uticaj na proces umrežavanja kukurbitina. Analiziran je  $3^3$  „full-factorial“ dizajn, primenom metode odzivnih površina za ispitivanje uticaja navedenih procesnih parametara na izlaznu veličinu, DP kukurbitina (Tabela 16). Izveden je set od 30 eksperimenata sa tri ponavljanja centralne tačke. Opseg i centralna tačka nezavisnih promenljivih izabrani su prema rezultatima preliminarnih ispitivanja i prikazani su u Tabeli 17.

**Tabela 16.** “Full factorial “eksperimentalni plan i odziv funkcije (DP).

$x_1$	$x_2$	$x_3$	DP (%)
-1	-1	-1	20.00
-1	-1	0	41.10
-1	-1	1	38.00
-1	0	-1	26.20
-1	0	0	53.75
-1	0	1	58.75
-1	1	-1	12.50
-1	1	0	41.25
-1	1	1	40.60
0	-1	-1	36.25
0	-1	0	54.37
0	-1	1	53.00
0	0	-1	49.30
0	0	0	72.50
0	0	0	72.10
0	0	0	72.80
0	0	1	70.60
0	1	-1	15.20
0	1	0	32.20
0	1	1	30.01
1	-1	-1	31.5
1	-1	0	50.50
1	-1	1	49.2
1	0	-1	30.00
1	0	0	61.00
1	0	1	59.00
1	1	-1	13.60
1	1	0	27.20
1	1	1	26.80

**Tabela 17.** Realne i kodirane vrednosti nezavisnih promenljivih korišćenih u metodi odzivnih površina za optimizaciju procesa enzimskog umrežavanja kukurbitina primenom TG.

Nezavisne promenljive	Simbol	Nivoi		
		-1	0	1
E/S odnos, (w/w)	$x_1$	1/7.5	1/5	1/3.75
Temperatura, (°C)	$x_2$	20	30	40
Vreme (min)	$x_3$	10	30	50

Rezultati primena ANOVA za ispitivanje značajnosti linearnih, kvadratnih i efekata interakcije tri izabrana nezavisna parametra ( $x_1$ ,  $x_2$ , i  $x_3$ ) na DP, kao i značajnost celog polinomnog modela prikazani su u Tabeli 18.

**Tabela 18.** ANOVA rezultati procesa enzimskog umrežavanja kukurbitina primenom TG

Efekti	Regresioni koeficijenti	Suma kvadrata	df	Srednji kvadrat	F	p-vrednost
Odsečak	66.5348					
<i>Linearni</i>						
$x_1$	0.925	15.40	1	15.40	0,5079	0,485710
$x_2$	-7.4756	1005.91	1	1005.91	33,1738	0,000023*
$x_3$	10.6339	2035.43	1	2035.43	67,1263	$2.63 \times 10^{-7}$ *
<i>Kvadratni</i>						
$x_1^2$	-8.1061	394.25	1	394.25	13,0021	0,002181*
$x_2^2$	-19.3844	2254.54	1	2254.54	74,3522	$1.29 \times 10^{-7}$ *
$x_3^2$	-11.5128	795.26	1	795.26	26,2269	0,000085*
<i>Interakcija</i>						
$x_1 \cdot x_2$	-4.9042	288.61	1	288.61	9,5180	0,006715*
$x_1 \cdot x_3$	-1.5625	29.30	1	29.30	0,9662	0,339419
$x_2 \cdot x_3$	0.305	1.12	1	1.12	0,0368	0,850117
Model		6819.83	9	757.758	24,990	$4.33 \times 10^{-8}$ *
Greška		515.48	17	30.3224		
Statistička analiza modela						
R = 0,9642						
$R^2 = 0.9297$						

\* Značajnost u okviru 99% pouzdanosti ( $p < 0.01$ )

Tumačenjem rezultata ANOVA testa, može se zaključiti da su gotovo svi efekti statistički značajni ( $p < 0.01$ ). Statističku značajnost ( $p > 0.05$ ) nemaju jedino efekat interakcije dva parametra ( $x_1 \cdot x_3$  i  $x_2 \cdot x_3$ ), kao i linearni efekat temperature ( $x_1$ ). Prema tome fitovani polinomni model koji izražava zavisnost DP kukurbitina kao funkciju statistički značajnih faktora može biti predstavljen sledećom jednačinom (22):

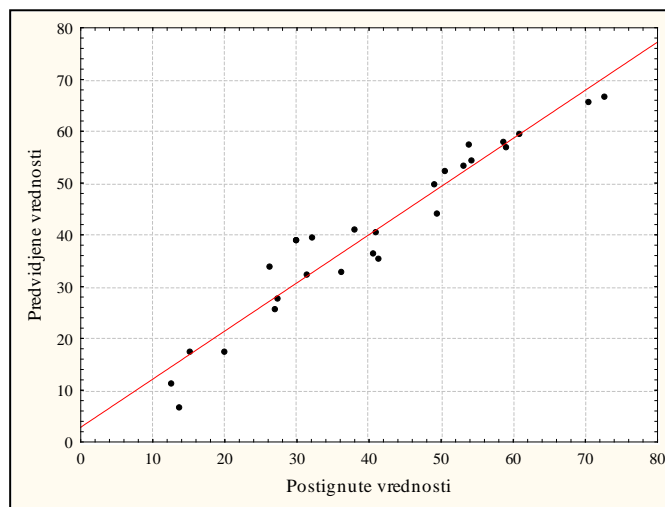
$$Y = 66.534 - 8.106x_1^2 - 7.475x_2 - 19.384x_2^2 + 10.633x_3 - 11.512x_3^2 - 4.904x_1x_2 \quad (22)$$



## Pouzdanost modela

Koeficijent determinacije  $R^2$  ima vrednost od 0.9297, što ukazuje na visoku saglasnost između postignutih i predviđenih rezultata. Ovo znači da predviđeni model definiše 92.97% ukupne varijabilnosti u okviru opsega ispitivane veličine. Grafik zavisnosti postignutih (eng. „observed“) i predviđenih (eng. „predicted“) vrednosti (eng. „Parity plot“) prikazan je na Slici 29. „Parity plot“ pokazuje prihvatljivi nivo poklapanja rezultata.

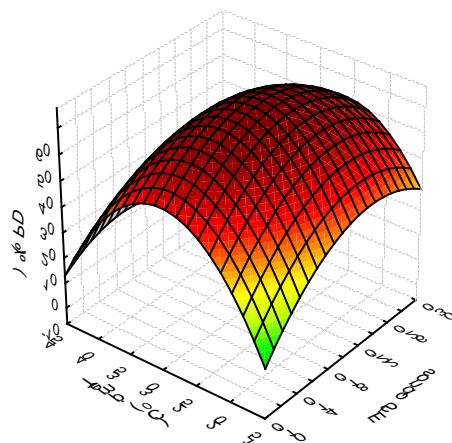
Ovo ukazuje da se predviđenim matematičkim modelom (22) može uspešno definisati proces umrežavanja kukurbitina.



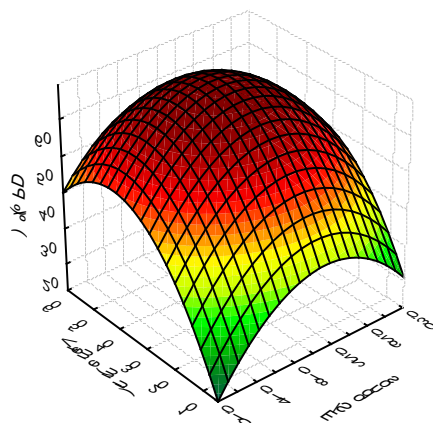
**Slika 29.** „Parity plot“ postignutih i predviđenih vrednosti DP u procesu umrežavanja kukurbitina primenom TG

## Optimizacija procesa

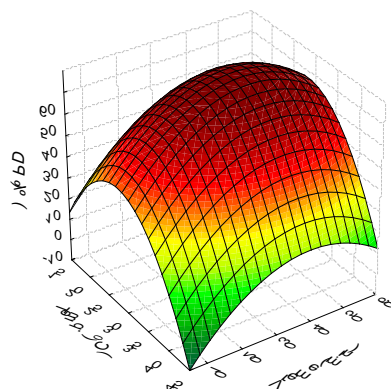
Na osnovu dobijenog modela (22) konstruisane su odzivne površine koje ilustruju glavne i uzajamne efekte nezavisnih promenljivih na izlaznu veličinu, DP kukurbitina (Slika 30). Jedna od promenljivih je zadržana na centralnom nivou, dok ostale dve promenljive menjaju vrednost u okviru eksperimentalnih opsega. Generalno, analiza odzivnih površina ukazuje da postoji kompleksna interakcija između promenljivih (Morgan, 1991). Uticaj E/S odnosa i temperature na vrednost DP kukurbitina prikazana je na Slici 30a (vreme ima vrednost na centralnoj tački). Temperatura pokazuje kvadratni efekat na vrednost DP. Vrednost za DP raste progresivno sa porastom vrednosti E/S odnosa sve do tačke 1/4.9, a zatim opada sa porastom vrednosti za E/S odnos iznad navedene vrednosti.



(a)



(b)



(c)

**Slika 30.** 3D grafik odzivnih površina zavisnosti DP kukurbitina od: (a) E/S odnosa i temperature (b) E/S odnosa i reakcionog vremena i (c) temperature i reakcionog vremena.

Uticaj E/S odnosa i reakcionog vremena prikazan je na Slici 30b (temperatura ima vrednost centralne tačke). Obe promenljive imaju kvadratni efekat, s tim što vreme ima veći uticaj na izlaznu veličinu. Vrednost DP kukurbitina naglo raste tokom vremena i već nakon 30 min enzimske reakcije postiže se maksimalna vrednost za DP kukurbitina. Slika 30c prikazuje kvadratne efekte i temperature i reakcionog vremena na vrednost DP, dok je E/S odnos na centralnom nivou.

Rezultati pokazuju da odzivne površine imaju tačku maksimuma funkcije u okviru opsega eksperimentalnih vrednosti ispitivanih nezavisnih promenljivih. Tačne koordinate optimalnih vrednosti nezavisnih promenljivih za postizanje maksimalne vrednosti DP kukurbitina dobijaju se primenom sledeće analitičke procedure. Stacionarna tačka (maksimum funkcije) se dobija izjednačavanjem izraza za parcijalne izvode funkcije sa nulom, kao što je prikazano sledećim jednačinama (23):

$$\begin{aligned}\partial Y/\partial x_1 &= -16.2122x_1 - 4.9042x_2 = 0 \\ \partial Y/\partial x_2 &= -7.4756 - 4.9042x_1 - 38.7688x_2 = 0 \\ \partial Y/\partial x_3 &= 10.6339 - 23.0242x_3 = 0\end{aligned}\quad (23)$$

Rešavanjem sistema linearnih jednačina (23) dobijaju su sledeći rezultati:  $x_1 = 0.06$ ,  $x_2 = -0.2$  i  $x_3 = 0.46$ . Preračunate (realne) vrednosti koje odgovaraju kodiranim vrednostima nezavisnih promenljivih ( $x_1$ ,  $x_2$  i  $x_3$ ) za postizanje maksimalne vrednosti DP prikazane su u Tabeli 19. Dodatnim eksperimentom, koji je izveden pri predviđenim optimalnim uslovima, potvrđen je optimum DP kukurbitina, jer je eksperimentalno dobijena vrednost za DP veoma bliska predviđenoj (Tabela 19).

**Tabela 19.** Poređenje predviđene i eksperimentalne vrednosti za DP kukurbitina pri optimalnim uslovima procesnih parametara.

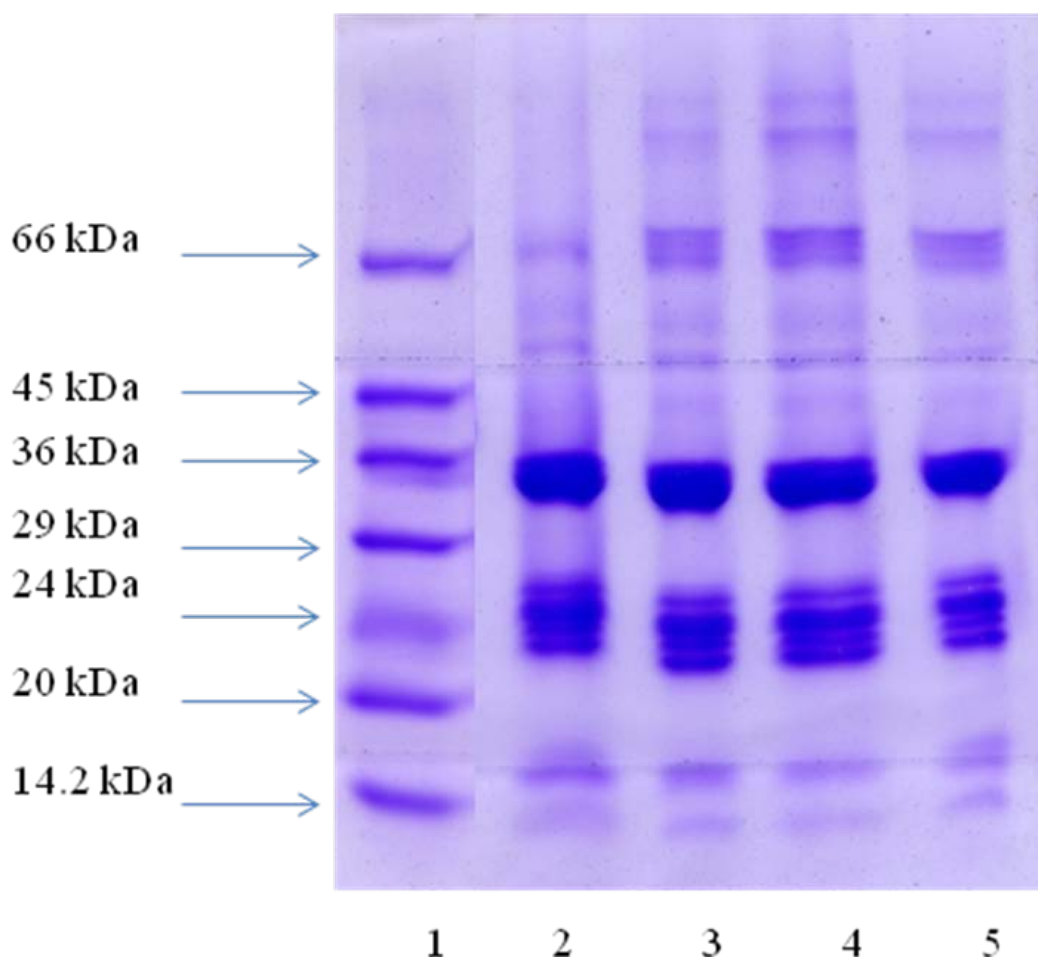
Nezavisne promenljive	Optimalne vrednosti	
E/S odnos (w/w)	1/4.9	
Temperatura (°C)	28	
Vreme (min)	39.2	
Odziv	Predviđeni	Eksperimentalni
DP (%)	69.74	70.06 ± 0.05

Kao što je prikazano u Tabeli 19, optimalna vrednost DP kukurbitina postiže se već na temperaturi od 28°C, nakon 39.2 minuta trajanja enzimske reakcije, nasuprot uslovima koji su predloženi od strane proizvođača, kompanije Ajinomoto (50°C i 10 minuta). I drugi autori, takođe, koriste niže temperature od temperature maksimalne aktivnosti enzima i predlažu izvođenje reakcije na nižim temperaturama, ali za duži vremenski period (Rodriguez-Nogales, 2006). Takođe, DP zavisi od dostupnosti reaktivnih glutaminskih ostataka lociranih na površini molekula (Lorenzen, 2007). Prema tome, broj reaktivnih glutaminskih ostataka koji je dostupan transglutaminazi, ograničen je zbog kompaktne globularne strukture kukurbitina pa zbog toga daljim povećanjem E/S odnosa preko optimalnog (1/4.9) ne postiže se povećanje vrednosti DP. Prema tvrđenju Jong i Koppelman (2002), može doći i do saturacije proteinskim supstratom, pa čak i veliki formirani polimeri mogu inhibirati reakciju, što objašnjava pojavu smanjenja vrednosti DP kukurbitina nakon postizanja maksimuma.

#### **4.5.2. Gel elektroforeza**

Umrežavanje kukurbitina dejstvom transglutaminaze potvrđeno je SDS gel elektroforezom. Ova metoda se smatra kao prihvatljiv način za praćenje procesa umrežavanja proteina primenom TG, zbog toga što se intermolekularno vezivanje prikazuje formiranjem novih traka koje odgovaraju podjedinicama visokih molekulskih masa (Pinterits i Arntfield, 2008).

Elektroforezni profil (Slika 31) pokazuje da enzimski tretman dovodi do pojave novih traka koje odgovaraju podjedinicama visokih molekulskih masa od oko 80 kDa. Ova pojava je praćena istovremenim nestankom traka malih molekulskih masa od 33 i 14 kDa, što ukazuje na formiranje polipeptida visokih molekulskih masa putem umrežavanja, slično su potvrdili Rossa i sar. (2011). Dejstvo TG na kukurbitin rezultiralo je formiranjem dve nove trake koje odgovaraju podjedinicama molekulske mase od oko 80 kDa (linije 3, 4 i 5), i čiji je intenzitet najveći u uzorku dobijenom pri optimalnim uslovima reakcije (linija 4), što i potvrđuje maksimum za DP kukurbitina.



**Slika 31.** Elektroforetski profili kukurbitina i umreženih modifikata. Markeri molekulske mase, 1; kukurbitin, 2; umreženi modifikati kukurbitina dobijeni dejstvom TG: E/S= 0.2 (w/w), na 28°C za 10 min, 3; E/S= 0.2 (w/w), na 28°C za 40 min- optimalni uslovi, 4; E/S= 0.2 (w/w), na 28°C za 60 min, 5.

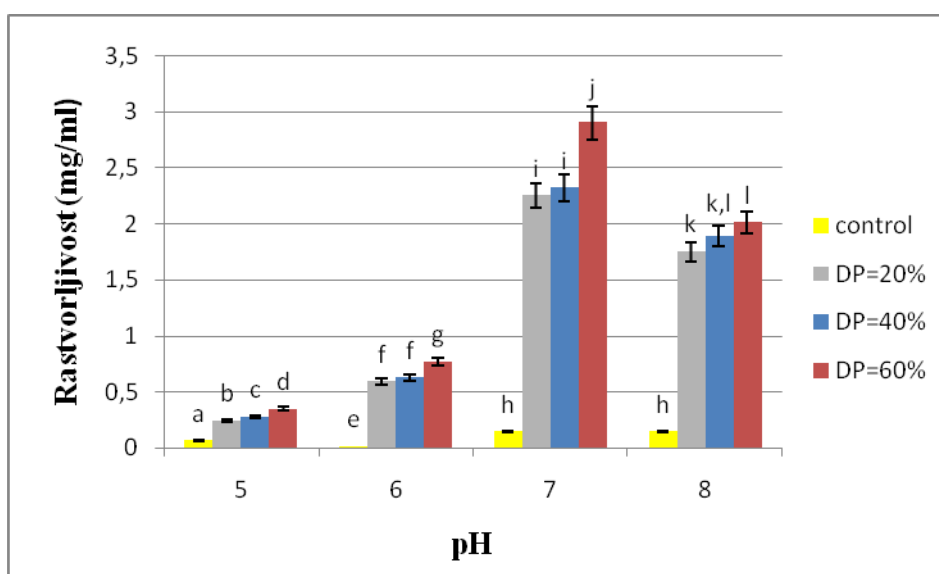
### 4.5.3. Funkcionalne osobine umreženih proteina

#### 4.5.3.1. Rastvorljivost

Rastvorljivost je jedna od najznačajnijih osobina proteina, kako je već unapred istaknuto, i ima veliki uticaj na sve ostale funkcionalne osobine. Kao što je prikazano na Slici 14 pH profil rastvorljivosti kukurbitina ima U-oblik, što je odlika proteina uljarica i leguminoza (Guan i sar., 2007). U ekstremno kiselim i baznim sredinama, rastvorljivost kukurbitina je relativno visoka (oko 10 mg/ml), ali u opsegu pH vrednosti od 5.0 – 8.0,

rastvorljivost se kreće u intervalu od 0.01-0.1 mg/ml. pH vrednosti većine prehrambenih proizvoda kreće se u opsegu gde kukurbitin ima izrazito malu rastvorljivost, pa time i njegov potencijal za moguću primenu je smanjen.

Na osnovu Slike 30 i regresione jednačine (22), kojima su definisani reakcioni uslovi za dobijanje određenih vrednosti DP, izabrani su uslovi za produkciju modifikata kukurbitina sa željenim DP radi ispitivanja njihove rastvorljivosti. Rastvorljivost kukurbitina i njegovih modifikata (DP vrednosti 20, 40 i 60%) u opsegu pH vrednosti od 5.0-8.0 prikazana je na Slici 32.



**Slika 32.** Uticaj pH vrednosti na rastvorljivost kukurbitina i polimera kukurbitina, različitih vrednosti DP, nastalih dejstvom TG.

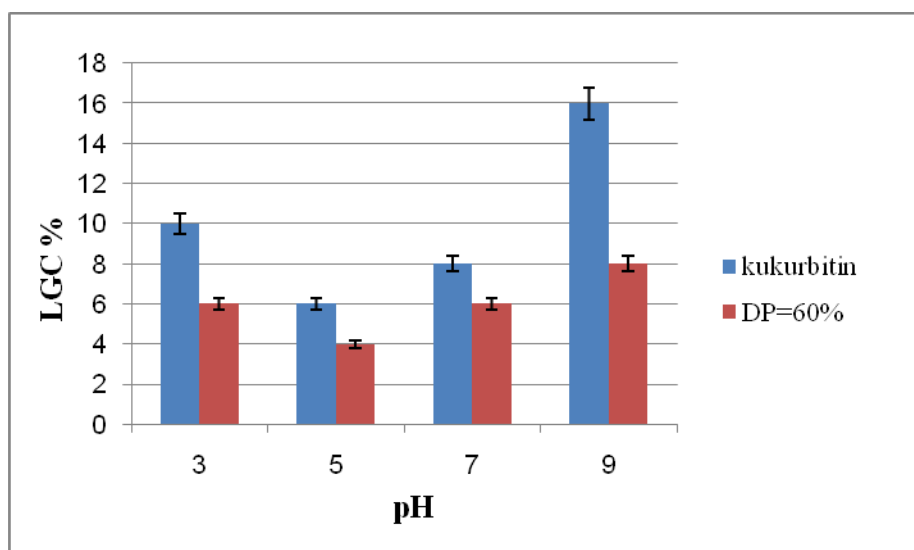
Sa Slike 32 se vidi da tretman sa TG dovodi do porasta rastvorljivosti kukurbitina u celom ispitivanom opsegu pH vrednosti. Pri pH vrednostima 5.0 i 6.0, rastvorljivost je slabo povišena, dok na pH vrednostima 7.0 i 8.0. porast u rastvorljivosti proteina je značajniji. Povećanjem vrednosti DP kukurbitina raste i rastvorljivost pri svim ispitivanim pH vrednostima.

Povećanje rastvorljivosti proteina dejstvom TG dokazali su i drugi autori. Ali i saradnici (2010) izučavali su dejstvo transglutaminaza na funkcionalne osobine proteinskih izolata dve vrste graška. Povećanje rastvorljivosti je zabeleženo u celom opsegu pH kod polimerizovanih proteina. Takođe, dejstvo TG na natrijum kazeinat dovodi do značajnog

povećanja rastvorljivosti u kiseloj sredini (pH 2.0 i 3.0). Povećanje rastvorljivosti kao posledica umrežavanja proteina u literaturi objašnjava se intra- i intermolekularnim odbijanjem naelektrisanja u polimerizovanom proteinu kao i zbog smanjenja površinske hidrofobnosti proteinskog molekula (Babiker, 2000).

#### 4.5.3.2. Sposobnost želiranja

Minimalna koncentracija želiranja (eng. „Least gelation concentration) LGC je veličina kojom je izražena sposobnost želiranja proteina. Uticaj pH vrednosti na vrednost LGC kukurbitina i njegovog polimera vrednosti DP = 60%, prikazan je na Slici 33. Razlike u sposobnosti želiranja proteina na različitim pH vrednostima nastaju usled razlika površinskog naelektrisanja proteina. Generalno, na pH vrednostima bliskim izoelektričnoj tački želiranja se povećava usled smanjenja površinskog naelektrisanja i odbojnih interakcija između proteinskih molekula (Adebowale i Adebowale, 2008).



**Slika 33.** Uticaj pH vrednosti na sposobnost želiranja kukurbitina i polimera kukurbitina, nastalog dejstvom transglutaminaTG

Rezultati prikazani na Slici 33. potvrđuju prethodno tvrđenje. Vrednost LGC kukurbitina je najniža (6%) na pH 5.0, gde je i rastvorljivost kukurbitina najniža. Dejstvom transglutaminaza smanjuje se vrednost LGC pri svim ispitivanim pH vrednostima. Slične rezultate dobili su i drugi autori, što je dokaz da je umrežavanje proteina dejstvom TG odličan

način za poboljšanje formiranja gela (Sun i Arntfield, 2011). Najbolje osobine želiranja umreženog kukurbitina se postižu na pH 5.0 gde vrednost za LGC iznosi 4%. Sa druge strane, najveće smanjenje vrednosti LGC kukurbitina dejstvom TG se postiže na pH 9.0, gde se LGC vrednost smanjuje sa 16% na 8%.



## 5. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. U okviru preliminiranih, komparativnih ispitivanja funkcionalnih osobina kukurbitina, dobijenog iz semena i iz pogače uljane tikve (*Cucurbita pepo*), utvrđeno je da ispitivane osobine (rastvorljivost, sposobnost formiranja pene i emulzije, adsorpcija ulja i vode) kukurbitina iz oba izvora nisu statistički različite ( $p < 0.05$ ). Prema tome, uljana pogača, koja se dobija kao nus proizvod u procesu hladnog ceđenja ulja iz semena uljane tikve, može uspešno da se koristi kao izvor za izolovanje kukurbitina koji ima iste funkcionalne karakteristika kao kukurbitin iz semena.
2. U cilju povećanja rastvorljivosti kukurbitina ispitivano je delovanje više fizičko-hemijskih parametara, kao što su pH, temperatura i koncentracija soli. U istraživanjima je primenjena RSM, kao savremeni naučni pristup za kontrolu i optimizaciju različitih procesa. Na osnovu dobijenih rezultata, zaključeno je da se računarskim modelovanjem uz primenu RSM-a može definisati matematička jednačina za optimizaciju uslova za postizanje maksimalne rastvorljivosti kukurbitina. Najveća rastvorljivost kukurbitina (9 mg/ml) može se dobiti na temperaturi od 54 °C, pH vrednosti 7.69 i koncentraciji NaCl 4%.
3. Optimizacija i kontrola procesa enzimske hidrolize kukurbitina izvedena je primenom RSM u cilju dobijanja hidrolizata tačno definisanih vrednosti DH. Matematički je definisana zavisnost između DH, kao izlazne veličine i E/S odnosa i vremena, kao parametara u procesu hidrolize kukurbitina primenom bromelaina. E/S odnos od 0.0132 g/g i vreme od 42 minuta definisani su kao optimalni uslovi za postizanje maksimalne vrednosti DH (36%) u procesu hidrolize kukurbitina bromelainom.
4. Ispitane su i međusobno poređene funkcionalne osobine: rastvorljivost, sposobnost formiranja pene i emulzije i adsorpciju ulja hidrolizata kukurbitina različitih vrednosti DH dobijenih dejstvom alkalaze, flavorzima, bromelaina i pepsina. Svi dobijeni hidrolizati pokazuju unapređenje ispitivanih funkcionalnih osobina u odnosu na nehidrolizovani protein-kukurbitin. Rastvorljivost kukurbitina naročito je povećana u opsegu pH vrednosti od 6.0-8.0, dejstvom svih enzima. Dodatno, primenom pepsina u procesu hidrolize dolazi do eliminacije izoelektrične oblasti iz krive rastvorljivosti kukurbitina. Najviše vrednosti za EAI i ESI (0.77 A<sub>500nm</sub> and

87.5min, respektivno) postignute su kod hidrolizata vrednosti DH 9.2 % dobijenog primenom flavorzima. Maksimalnu vrednost za FC ( $242 \pm 3.21$  %) ima hidrolizat dobijen primenom alkalaze DH vrednosti od 30%.

5. Praćenjem uticaja pH i koncentracija NaCl, ustanovljeno je da ispitani parametri značajno ( $p < 0.05$ ) utiču na karakteristike pene (FC i FS) i na rastvorljivost hidrolizata kukurbitina dobijenog primenom alkalaze sa DH vrednosti od 30%. Rezultati su pokazali da ispitivani hidrolizat ima najviše vrednosti FS i FC na pH 4.0 u rastvorima bez dodatka soli, ukazujući na njegov potencijal primene u hrani.
6. U cilju dobijanja proteinskih hidrolizata kao multifunkcionalnih ingredijenata hrane ili drugih proizvoda, ispitan je antioksidativni potencijal hidrolizata kukurbitina dobijenih dejstvom alkalaze i pepsina. Dokazano je da vrednost antioksidativne aktivnosti, merene kao sposobnost hvatanja ABTS radikal katjona i redukujuće moći  $Fe^{3+}$  jona, raste sa porastom DH. Hidrolizat alkalaze sa DH 30%, u kojem je utvrđena najveća antiradikalska aktivnost ( $3.4 \pm 0.02$  mM TEAC/mg) i redukujuća moć od 0,25 je ujedno i hidrolizat sa najvišim vrednostima FS i FC, pa prema tome ovaj hidrolizat ima visoki potencijal za primenu kao multifunkcionalni aktivni sastojak u hrani.
7. U cilju unapređenja funkcionalnih osobina kukurbitina, kao i proširenja mogućnosti primene, izvršena je modifikacija proteinske strukture umrežavanjem u prisustvu enzima transglutaminaze. Primenom RSM optimiziran je proces umrežavanja. Matematički je definisana zavisnost između DP, kao izlazne veličine i E/S odnosa, temperature i vremena, kao parametara u procesu umrežavanja kukurbitina. E/S odnos 1/4.9, temperature od  $28^{\circ}C$  i vreme od 39 minuta definisani su kao optimalni uslovi za postizanje maksimalne vrednosti DP (70%) u procesu umrežavanja kukurbitina dejstvom transglutaminaze.
8. Umrežavanjem kukurbitina, dejstvom transglutaminaze, nastali su modifikovani proteini poboljšanih vrednosti rastvorljivosti i sposobnosti želiranja u odnosu na nativni kukurbitin. Rastvorljivosti kukurbitina dejstvom transglutaminaze povećana je i do pet puta u opsegu pH vrednosti od 5.0 do 8.0 gde kukurbitin i ima najmanju rastvorljivost (oko 0.5 mg/ml). Takođe, dokazana je korelacija rastvorljivosti modifikata i vrednosti DP. Porstom vrednosti DP kukurbitina raste i rastvorljivost pri svim ispitivanim pH vrednostima. Najbolje osobine želiranja umreženog kukurbitina se postižu na pH 5.0 gde vrednost za LGC iznosi 4%. Sa druge strane, najveće

zmanjenje vrednosti LGC kukurbitina dejstvom TG se postiže na pH 9.0, gde se LGC vrednost smanjuje sa 16% na 8%.

9. Svi navedeni rezultati pokazuju da kukurbitin predstavlja pogodan supstrat za enzimske procese, hidrolize i umrežavanja, u cilju dobijanja modifikata unapređenih funkcionalnih osobina. Primena enzima za produkciju visoko funkcionalnih proteina iz uljanih pogača može biti praktična tehnologija koja omogućuje prevođenje nus proizvoda u nove izvore ingredijenata hrane.

## 6. LITERATURA

1. Acharya, A. S., Y. J. Cho, & B. N. Manjula. (1988) Cross-Linking of Protein by Aldotriose: Reaction of the Carbonyl Function of the Keto Amines Generated *in Situ* with Amino Groups. *Biochemistry* 27: 4522-4529.
2. Adebawale, Y.A., & Adebawale, K.O. (2008). Evaluation of the gelation characteristics of mucuna bean flour and protein isolate. *Electronic Journal of Environmental, Agriculture and Food Chemistry*, 7(9), 3206 – 3222.
3. Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food proteins hydrolysates by trinitrobenzene sulfonic acid. *Journal of American Chemical Society*. 45: 1256-1262.
4. Adler-Nissen, J. (1982): Limited enzymatic degradation of proteins: a new approach in the industrial application of hydrolases. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 1: 138–156.
5. Adler-Nissen, J. (1986) *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*; Elsevier Applied Science Publishers: London.
6. Adler-Nissen, J. (1993) Proteases. In *Enzymes in food processing*; Nagodawithana, T., Reed, G., Eds.; Academic Press: San Diego, 159-203.
7. Aguilera, J.M. (1995) Gelation of whey proteins. *Food Technology*, 49, 83-89.
8. Agyare, K.K., Xiong, Y.L., & Addo, K. (2008). Influence of salt and pH on the solubility and structural characteristics of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate. *Food Chemistry*, 107, 1131-1137.
9. Ahmad, N.H. & Hall, G.M. (1989). Functional properties of enzymatically hydrolysed fish waste. In *Trends in Food Technology*, ed. N.B. Hen, L.K. Kong, Singapore Institute of Food Science and Technology, Singapore, 75-75.
10. Althouse, P.J., Dinakar, P., Kilara, A. (1995) Screening of Proteolytic Enzymes to Enhance Foaming of Whey Protein Isolates. *Journal of Food Science*, 60 (5) 1110-1112.
11. Ames, J. M. (1992). The Maillard reaction in foods. In B. J. F. Hudson (Ed.), *Biochemistry of food proteins* (99–153). Elsevier Applied Science.

12. Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uschio, R., Tanaka, H. & Motoki, M., (1989). Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry* 53:2613-2617.
13. Anjum, M. F., Tasadduq, I., & Al-Sultan, K. (1997). Response surface methodology: A neural network approach. *European Journal of Operational Research*, 101, 65–73.
14. Anuchit, A. (2006) Factors Affecting the Properties of Round Scad Muscle Protein Films, and the Improvement of its Mechanical and Water Vapor Permeability Properties, Prince of Songkla University.
15. Ali, N.A., Ahmed, S.H., Mohamed, E.A., Mohamed Ahmed, I.A., & Babiker, E.E. (2010). Effect of transglutaminase cross linking on the functional properties as a function of NaCl concentration of legumes protein isolate. *International Journal of Biological and Life Science*, 6(1), 8-13.
16. Ahmedna, M., Prinyawiwatkul, W., Rao, R.M. (1999): Solubilized wheat protein isolate: Functional properties and potential food applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1340–1345.
17. Aluko, R. E. & Yada, R. Y. 1993. Relationship of hydrophobicity and solubility with some functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 62: 331-335.
18. An, H., Peters, M.Y. & Seymour, T.A. (1996) Roles of endogenous enzymes in surimi gelation. *Trends in Food Science and Technology*, 7: 321-327.
19. AOAC (1995). Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis 16th ed.* Washington DC.
20. Arihara, K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science*, 74, 219–229.
21. Arogundade, L. A., Tshay, M., Shumey, D & Manazie, S. (2006) Effect of ionic strength and/or pH on extractability and physicochemical characterization of broad bean (*Vicia faba* L.) protein concentrate. *Food Hydrocolloids*. 20, 1124-1134.
22. Arcan, I. & Yemenicioğlu, A. (2010) Effects of controlled pepsin hydrolysis on antioxidant potential and fractional changes of chickpea proteins. *Food Research International*, 43, 140–147.

23. Babiker, E.E. (2000). Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein. *Food Chemistry*, 70, 139-145.
24. Barker, L. D., Martens, R. W., & Murray, E. D. (2002). Production of oilseed protein isolate. Int. Patent WO 02089597.
25. Bas, D., Boyaci, I.H. (2007): Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology, *Journal of Food Engineering* 78: 836–845.
26. Beg, Q. K., Sahai, V., & Gupta, R. (2003). Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. *Process Biochemistry*, 39, 203–209.
27. Beg, Q. K., Saxena, R. K., & Gupta, R. (2002). Kinetic constants determination for an alkaline protease from *Bacillus mojavensis* using response surface methodology. *Biotechnology and Bioengineering*, 78(3), 289–295.
28. Berenji J. (1999). Tikve – hrana, lek i ukras. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo* 31: 63 – 75, Novi Sad.
29. Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., Lalitha, R.G. (2008): Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of *Catla (Catla catla)* for preparing protein hydrolysate using a commercial protease, *Bioresource Technology* 99: 335–343.
30. Bindels, J.G. (1992) Peptiden in de Voeding. *Voeding* 53(10): 253–257.
31. Bishop, P.D. & Lasser, G. (1997) Inventors; Zymogenetics, assignee. Cross-linked protein gels and methods of making them. WO 9740701.
32. Blagoreve, R. I., Lilley, G. G. (1979): Characterisation of cucurbitin from various species of the Cucurbitacea. *European Journal of Biochemistry*, 103: 577-584.
33. Blagrove, R.J, Lilley, G.G and A.A Kortt (1981) Partial Tryptic Digestion of Cucurbitin from Pumpkin Seed *Australian Journal of Plant Physiology* 8(6) 507 – 513.
34. Bocevska, M., Karlović, Dj., Turkulov, J. and Peričin, D. (1994) The quality of corn germ oil obtained by aqueous enzymatic extraction, *Journal of American Oil Chemistry Society*, 70, 1273-1277.
35. Boyaci, I. H., Williams, P. C., & Koxsel, H. (2004). A rapid method for the estimation of damaged starch in wheat flours. *Journal of Cereal Science*, 39, 139–145.

36. Broderick, E.P., O'Halloran, D.M., Rotchev, Y.A., Griffin, M., Collighan, R.J. & Pandit, A.S. (2004) Enzymatic stabilization of gelatin-based scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 72B, 37-42.
37. Burg, H. C. J., & Van den Burg, B. M. (1996). State of the art of large- scale genetic purity testing of hybrid vegetable seeds using isoelectric focusing at Petosluis. *Electrophoresis*, 17, 502-504.
38. Burnett G.R., Rigby N.M., Mills E.N.C., Belton P.S., Fido R.J., Tatham A.S. and Shewry P.R (2002). Characterization of the emulsification properties of 2S albumins from sunflower seed. *Journal of Colloidal Interface Science* 247, 177-185.
39. Caili, F., Huan, S., & Quanhong, L. (2006). A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61, 73–80.
40. Capelli, L., Forland, F., Perini, F., Guerrieri, N., Cerletti, P., & Righetti, P. G. (1998). Wheat cultivar discrimination by capillary electrophoresis of gliadins in isoelectric bufer. *Electrophoresis*, 19, 311-318.
41. Church, F.C., Swaisgood, H.E., & Catignani, G.L. (1983). Spectrophotometric assay using *o*-phthaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66, 1219-1227.
42. Clemente, A. (2000): Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science& Technology* 11, 254-262.
43. Colman, P., Suzuki, E., & Van Donkelaar, A. (1980). The structure of cucurbitin: subunit symmetry and organization *in situ*. *European Journal of Biochemistry*, 103, 585-588.
44. CP Kelco. (2004). Application Bulletin: Refreshing Dairy Beverages – GENU®: a key ingredient in stabilization of yoghurt drinks and juice-milk drinks. Printed product guide.
45. Cao, W., Zhang, Ch., Hong, P., Ji, H. (2008) Response surface methodology for autolysis parameters optimization of shrimp head and amino acids released during autolysis, *Food chemistry* **109**:176–183.
46. Caessens, P.W.J.R. (1999) Enzymatic hydrolysis of b-casein and b-lactoglobulin. Foam and emulsion properties of peptides in relation to their molecular structure. Ph.D. Thesis, Wageningen Agricultural University, the Netherlands.
47. Caessens, P.W.J.R.; Visser, S.; Gruppen, H. & Voragen, A.G.J. (1999) b-Lactoglobulin hydrolysis. I. Peptide composition and functional properties of

- hydrolysates obtained by the action of plasmin, trypsin, and *Staphylococcus aureus* V8 protease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2973-2979.
48. Carrasco, B., Harding, S. E., & Garcia de la Torre, J. (1998). Bead modeling using HYDRO and SOLPRO of the conformation of multisubunit proteins: sunflower and rape seed 11S globulins. *Bio-Chemistry*, 74, 127±133.
49. Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S., Marc, I. (2007): Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of rapeseed hydrolysates. *Process Biochemistry*, **42**: 1419-1428.
50. Charalambous, G. & Doxastakis, G. (1989). *Food Emulsifiers: Chemistry, Technology, Functional Properties, and Applications*, New York: Elsevier.
51. Cheftel J.C., Cuq, J.L., Lorient, D. (1985). Amino acids, peptides and proteins. In *Food Chemistry*, Fennema O.R., New York: Marcel Dekker
52. Chobert, J.M.; Bertrand-Harb, C. & Nicolas, M.G. (1988) Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 36, 883-892.
53. Cortez, J., Boner, P.L.R. & Griffin, M. (2004) Application of transglutaminases in the modification of wool textiles. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 64-72.
54. Cuq, B. (2002) *Formation and Properties of Fish Myofibrillar Protein Films and Coatings*, CRC Press, New York.
55. Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M., & Shahidi, F. (2008) Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 109, 144 -148.
56. Dagnia, S. G., Petterson, D. S., Bell, R. R., & Flanagan, F. V. (1992). Germination alters the chemical composition and protein quality of lupine seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60(4),419–423.
57. Damodaran, S. (1997). Food proteins: An overview. In S. Damodaran & A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their applications* (pp. 1–21). New York: Marcel Dekker.
58. Daoud, R., Dubois, V., Bors-Dodita, L., Nedjar-Arroume, N., Krier, F., Chihib, N., Mary, P., Kouach, M., Briand, G., Guillochon, D. (2005). New antimicrobial peptide derived from bovine hemoglobin. *Peptides*, 26, 713–719.
59. Day, L., Augustin, M.A., Batey, I.L. & Wrigley, C.W. (2006) Wheat-gluten uses and industry needs. *Trends in Food Science & Technology*, 17 (2), 82-90.



60. de Carvalho, R. A., and C. R. F. Grosso. (2004) Characterisation of Gelatin Based Films Modified with Transglutaminase, Glyoxal and Formaldehyde. *Food Hydrocolloids* 18: 717-726.
61. de Roos, A. (2009). Protein Hydrolysates and bioactive peptides. Add value to your egg products, IEC Meeting, March 2009.
62. Dev, D.K. & Mukherjee, K.D. (1986) Functional properties of rapeseed protein products with varying phytic acid contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 34, 775-780.
63. Dickinson E. (1992) Foams. In An introduction to food colloids; Dickinson E., eds; Oxford University Press: Oxford, 123-139.
64. Dickinson E. (1994) Protein-stabilized emulsions. *Journal of Food Engineering*, 22, 59-74.
65. Dixon, M. & Webb, E.C. (1979). Enzymes. New York: Academic Press.
66. Diosady, L.L. (2007). Personal communication. Professor, Food Engineering Laboratory, Dept. of Chemical Engineering and Applied Science, University of Toronto.
67. Damodaran, S. & Paraf, A. (1997) *Food Proteins and Their Application*; Dekker: New York.
68. Domínguez, H., Nùñez, M. J. & Lema, J. M. (1994): Enzymatic pretreatments to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: review. *Food Chemistry*, 49, 271-286
69. Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y. & Yang, H. (2008) Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107, 1485-1493.
70. Dua, S., Mahajan, A., & Mahajan, A. (1996). Improvement in functional properties of rapeseed (*Brassica Campestris var. Toria*) preparations by chemical modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 706–710.
71. Dudek, F., Horstmann, C. & Schwenke, K.D. (1996) Limited tryptic hydrolysis of legumin from faba bean (*Vicia faba*) L. formation of an “unequal” subunit pattern. *Nahrung* 40, 171-176.
72. Duran, R., Junqua, M., Schmitter, J.M., Gancet, C. & Goulas, P. (1998) Purification, characterisation, and gene cloning of transglutaminase from *Streptovercillium cinnamoneum* CBS 683-68. *Biochimie* 80: 313-319.

73. Easa, A. M., et al. (1996a). Maillard induced complexes of bovine serum albumin—a dilute solution study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 18, 297–301.
74. Easa, A. M., et al. (1996b). Bovine serum albumin gelation as a result of the Maillard reaction. *Food Hydrocolloids*, 10, 199–202.
75. El-Adawy, T.A. (2000): Functional properties and nutritional quality of acetylated and succinylated mung bean protein isolate. *Food Chemistry*, Vol. 70(1), 83-91.
76. El-Adawy, T. A. & Taha, K. M. (2001): Characteristics and composition of different seed oils and flours. *Food Chemistry*, 74, 47-54.
77. El-Soukkary, F. A. H. (2001): Evaluation of pumkin seed products for bread fortification. *Plant Foods for Human Nutrition* 56, 365-384.
78. Ellinger, R.H. (1972). *Phosphates as Food Ingredients*, CRC Press (Chemical Rubber Co): Cleveland, Ohio.
79. Esdal (1947)The plasma proteins and their fractionation. *Advance Protein Chemistry*, 3, 383-389.
80. Faccio, G. (2011) Discovery of oxidative enzymes for food engineering; Tyrosinase and sulfhydryl oxidase, Academic dissertation, Faculty of Biological and Environmental Sciences Department of Biosciences – Division of Genetics, University of Helsinki, Helsinki, Finland.
81. Fayle, S. E., et al. (2000). Crosslinkage of proteins by dehydroascorbic acid and its degradation products. *Food Chemistry*, 70, 193–198.
82. Fayle, S. E., et al. (2001). Novel approaches to the analysis of the Maillard reaction of proteins. *Electrophoresis*, 22, 1518–1525.
83. Feeney, R. E., & Whitaker, J. R. (1988). Importance of cross-linking reactions in proteins. *Advances in Cereal Science and Technology*, 9, 21–43.
84. Fennema, O. (1982) Behavior of Proteins at Low Temperatures. In: *Food Protein Deterioration: Mechanisms and Functionality*, Edited by Cherry, J. P., Washington D.C.: ACS Symposium Series 206:110-133.
85. Fennema, O.R. (1993). *Food Chemistry*, New York: Marcel Dekker, 2nd Ed
86. Fesus, L., & Piacentini, M. (2002) Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochemistry Science* 77, 534-539.
87. Franzen, K. L., & Kinsella, J. E. (1976). Functional properties of succinylated and acetylated leaf protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, 914–919.

88. Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, K. M., Ramachandran, S., Ghosh, S, Szakacs, G., Pandey, A. (2003). Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 15, 107–115.
89. Frokjaer, S. (1994) Use of protein hydrolysates for protein supplementation. *Food Technology* 48(10):86–88.
90. Fukushima, D. (1991). Structures of plant storage proteins and their function. *Food Reviews International*, 7(3), 353-381.
91. Fukushima, D. (1994). Recent progress on biotechnology of soybean proteins and soybean protein food products. *Food Biotechnology*, 8(2-3), 83-135.
92. Galietta, G., L. Di-Gioia, S. Guilbert, & B. Cuq. (1998) Mechanical and Thermochemical Properties of Films Based on Whey Proteins as Affected by Plasticizer and Cross-linking Agents. *Journal of Dairy Science* 81: 3123-3130.
93. Galvao, C.M.A.; Silva, A.F.S.; Custodio, M.F.; Monti, R. & Giordano, R.D.C. (2001) Controlled hydrolysis of cheese whey proteins using trypsin and alpha-chymotrypsin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91- 93, 761-776.
94. Gerrard, J. A., S. E. Fayle, P. A. Brown, K. H. Sutton, L. Simmons, & I. Rasiah. (2001) Effects of Microbial Transglutaminase on the Wheat Proteins of Bread and Croissant Dough. *Journal of Food Science* 66: 782-786.
95. Gerrard, J. A. et al. (1998). Dehydroascorbic acid mediated crosslinkage of proteins using Maillard chemistry—relevance to food processing. In J. O'Brien et al. (Eds.), *The Maillard reaction in foods and medicine*. Cambridge: Royal Society of Chemistry (127–132).
96. Gerrard, J. A., et al. (1999). Covalent protein adduct formation and protein cross-linking resulting from the Maillard reaction between cyclotene and a model food protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1183–1188.
97. Gerrard, J. A. (2002) Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications, *Trends in Food Science & Technology* 13, 391–399.
98. Gerrard, J. A., P. K. Brown, and A. E. Fayle. (2003a). Maillard Crosslinking of Food Proteins III: The Effects of Glutaraldehyde, Formaldehyde and Glyceraldehyde upon Bread and Croissants. *Food Chem.* 80: 45-50.

99. Gerrard, J. A., P. K. Brown, and S. E. Fayle. (2003b). Maillard Crosslinking of Food Proteins II: The Reactions of Glutaraldehyde, Formaldehyde and Glyceraldehyde with Wheat Proteins *in vitro* and *in situ*. *Food Chem.* 80: 35-43.
100. German J.B. and Phillips L. (1991) Protein interactions in foams. In Protein functionality in food systems; Hettiarachy N. S. and Ziegler G. R., eds; IFT Basic Symposium Series: Chicago, 181-208.
101. Golovanov, A.P. Hautbergue, G. M., Wilson, S. A. and Lian, L. (2004) A simple method for improving protein solubility and long-term stability. *Journal of American Chemical Society*, 126: 8933-8939.
102. Gonzáles-Pérez, S. (2003) Physico-chemical and functional properties of sunflower proteins, Ph.D. thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
103. Gonzáles-Pérez, S., Vereijken, J. M. (2007): Sunflower proteins: Overview of their physicochemical, structural and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **87**: 2173-2191.
104. Govindaraju, K., Srinivas, H. (2006): Studies on the effect of enzymatic hydrolysis on functional and physico-chemical properties of arachin. *LWT- Food Science and Technology*, **39**: 54-62.
105. Gruener, L. & Ismond, M.A. (1997) Effects of acetylation and succinylation on the functional properties of the canola 12S globulin, *Food Chemistry*, 60(4), 513-520.
106. Guan, X., Yao, H., Chen, Z., Shan, L., & Zhang, M. (2007). Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin. *Food Chemistry*, 101, 163-170.
107. Guerard, F., Sumaya-Martinez, M.T., Laroque, D., Chabeaud A., Dufossé, L. (2007): Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards, *Process Biochemistry* **42**: 1486–1491.
108. Guo, M.R.; Fox, P.F.; Flynn, A. & Kindstedt, P.S. (1995) Susceptibility of beta-lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin. *Journal of Dairy Science* 78, 2336-2344.
109. Guo, Y., Pan, D., Tanokura, M. (2009). Optimization of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides

- from whey protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 114, 328–333.
110. Gbogouri, G., Linder, M., Fanni, J. & Parmentier, M. (2004) Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproduct hydrolysates. *Journal of Food Science*, 69, 615–622.
111. Ghorpade, V. M., H. Li, A. Gennadios, & M. A. Hanna. (1995) Chemically Modified Soy Protein Films. *Trans. Am. Soc. Chem. Eng.* 38: 1805-1808.
112. Gimenez, B., Aleman, A., Montero, P. & Gomez-Guillen M. (2009) Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114, 976-983.
113. Ha, C.-R. & Iuchi, I. (2003) Transglutaminase. In: Handbook of food enzymology. Whitaker, J.R., Voragen, A., & Wong, D.W.S. (Eds.). Marcel Dekker Inc., New York. 637-655.
114. Hara-Nishimura I, Nishimura, M., Matsubara H., & Akazawa T. (1982). Suborganellar localization of proteinase catalysing the limited hydrolysis of pumpkin globulin. *Plant Physiology*, 70, 699–703.
115. Haard, N. (2001) Enzymic modification of food proteins. In: Z. Sikorski, Editor, *Chemical and Functional Properties of Food Proteins*, Technomic Publishing, Lancaster, PA
116. Hagen, H., & Sandnes, K. (2004) Process for improvement of meat quality in fish, protein hydrolysate and method of producing a protein hydrolysate. *International Patent No.* WO 2004071202.
117. Halaouli, S., Asther, Mi., Kruus, K., Guo, L., Hamdi, M., Sigoillot, J.-C., Asther, M., & Lomascolo, A. (2005) Characterisation of a new tyrosinase from *Pycnopus* species with high potential for food technological applications. *Journal of Applied Microbiology* 98: 332-343.
118. Halling P.J. (1981) Protein-stabilized foams and emulsions. *CRC Critical Review of Food and Science Nutrition*, 15, 155-20
119. Han, X.Q. & Damondaran, S. (1996) Thermodynamic compatibility of substrate proteins affects their cross-linking by transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1211-1217.
120. Hara I., K Wada, H Matsubara (1976) Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed globulin. II. Alterations during germination. *Plant Cell Physiology* 17: 815-823.

121. Heng, L. (2005): Flavour Aspects of pea and its Proteins Preparation in Relation to Novel Protein Food. <http://library.wur.nl/wda/dissertations/dis3766>.
122. Hill, S. E., and A. M. Easa. (1998) Linking Proteins using the Maillard Reaction and the Implication for Food Processors. Pages 133-138 in J. O'Brien, H. E. Nursten, M. J. C. Crabbe, and J. M. Ames, eds. *The Maillard Reaction in Foods and Medicine*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
123. Hiller, B., & Lorenzen, P.C. (2009). Effect of phosphatase/transglutaminase treatment on molar mass distribution and techno-functional properties of sodium caseinate. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 87-92.
124. Hojilla-Evangelista, M.P., Sessa, D.J. & Mohamed, A. (2004) Functional properties of soybean and lupin protein concentrates produced by ultrafiltration-diafiltration. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 81, 1153-1157.
125. Hung, N.D., Vas, M., Cheke, E. & Bolesi, S.Z.A. (1984). Relative tryptic digestion rates of food proteins. *Journal of Food Science*, 49: 1535- 1542.
126. Icekson, I. & Apelbaum, A. (1987) Evidence for transglutaminase activity in plant tissue. *Plant Physiology* 84: 972-974.
127. Ichinose, A., Bottenus, R.E., and Davie, E.W. (1990) Structure of transglutaminases. *Journal of Biology and Chemistry* 265, 13411-13414.
128. Irissin-Mangata, J., Banduin, G., Boutevin, B., Gontard, N.(2001) New plasticizers for wheat gluten films, *Euro Polymer Journal*. 37.
129. Ismail, A., Linder, M., & Ghoul, M. (1999). Optimization of butylgalactoside synthesis by b-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 208–213.
130. Iyer, H.V. & Przybycien, T.M. (1994). Protein precipitation: effects of mixing on protein Solubility. *AIChE Journal*, 40(2): 349- 360.
131. Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D. & Juan, F., (2010) Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121, 178–184.
132. Jaros, D., Partschefeld, C., Henle, T., & Rohm, H. (2006) Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics and applications. *Journal of Texture Studies*, 37, 113-155.

133. Joseph, D., Lanier, T.C., & Hamann, D.D. (1994) Temperature and pH affect transglutaminase-catalyzed setting of crude fish actomyosin. *Journal of Food Science* 59, 1018-1036.
134. Jung, S., Murphy P.A., Johnson, L.A. (2005): Physicochemical and functional properties of soy protein substrates modified by low levels of protease hydrolysis. *Journal of Food Science*, **70**: 180–186.
135. Jong, G.A.H., & Koppelman, S.J. (2002). Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. *Journal of Food Science*, 67(8), 2798-2806.
136. Johnson, E. A., & Brekke, C. J. (1983). Functional properties of acylated pea protein isolates. *Journal of Food Science*, 48, 722–725.
137. Kabirullah, M., & Wills, R. B. H. (1982). Functional properties of acetylated and succinylated sunflower protein isolate. *Journal of Food Technology*, 17, 235.
138. Kahn, D.R. & Cohen, I. (1981) Factor XIIIa-catalyzed coupling of structural proteins. *Bochemica et Biophysica Acta* 668, 490-494.
139. Kato, A., Ibrahim, H. R., Watanabe, H., Honma, K., & Kobayashi, K. (1990). Structural and gelling properties of dry-heating egg white proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 32-37.
140. Kato A, Wada T, Kobayashi K, Seguro K, Motoki M (1991) Ovomucin-food protein conjugates prepared through the transglutaminase reaction. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 1027–1031.
141. Kester, J. J. & Richardson T. (1984). Modification of whey proteins to improve functionality, *Journal of Dairy Science* 67:2757-2774
142. Khalid, E. K., Babiker, E. E., & EL Tinay, A. H. (2003). Solubility and functional properties of sesame seed proteins as influence by pH and/or salt concentration. *Food Chemistry*, 82, 361-366.
143. Kikuchi, M., H. N. Matsumoto, T. Yamada, Y. Koyama, K. Takakuda, & J. Tanaka. (2004) Glutaraldehyde Cross-linked Hydroxyapatite/collagen Self-organized Nanocomposites. *Biomaterials* 25: 63-69.
144. Kim, K.S. & Rhee, J.S. (1989). Effects of acetylation on physicochemical properties of 11S soy protein. *Journal of Food Biochemistry* 13: 187-199.
145. Kim, K.S. & Rhee, J.S. 1990. Effect of acetylation on emulsifying properties of glycinin *Journal of Agricultural Food Chemistry* 38: 669-674.

146. Kinsella, J. E. (1976). Functional properties of food proteins: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7, 219–280.
147. Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007) Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102, 1317-1327.
148. Kneifel, W. & Seiler, A. (1993) Water holding capacity of milk protein products. *Food Structure*, 12, 297-308.
149. Kobayashi, E., Hashiguchi, K., Yikozeki, K., and Yamanaka, S. (1998) Molecular cloning of the transglutaminase gene from *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Bioscience of Biotechnology and Biochemistry*, 62, 1109-1114.
150. Koller, W., Frevert, J. & Kindl, H. (1979) Albumins, glyoxysomal enzymes and globulins in dry seeds of *Cucumis sativus*: qualitative and quantitative analysis. *Z. Physiol. Chem.* 360, 167 - 176.
151. Kong, X., Zhou, H. & Qian, H. (2007) Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chemistry*, 101, 615-620.
152. Korhonen, H., Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297–1308.
153. Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to application. *Journal of Functional Foods*, 1, 177–187.
154. Krause, J.-P. (2002): Comparison of the effect of acylation and phosphorylation on surface pressure, surface potential and foaming properties of protein isolates from rapeseed (*Brassica napus*). *Industrial Crops and Products*, 15(3), 221-228
155. Krinstinsson H. & Rasco, B. (2000) Biochemical and functional properties of Atlantic salmon muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 657–666.
156. Kunst, T. (2003) Protein Modification to Optimize Functionality Protein Hydrolysates in: Handbook of Food Enzynology, edited by: Whitaker, J., Voragen, A.& Wong, D., Marcel Dekker, New York.



157. Kuraishi, C., et al. (2000). Application of transglutaminase for food processing. *Hydrocolloids*, 2, 281–285.
158. Laemmli, U.K., (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
159. Larré, C., Denery-Papini, S., Popineau, Y., Deshayes, G., Desserme, C. & Lefebvre, J. (2000) Biochemical analysis and rheological properties of gluten modified by transglutaminase. *Cereal Chemistry* 77, 32-38.
160. Larre, C., Mulder, W., Sanchez-Vioque, R., Lazko, J., Berot, J., Gueguen, J. & Popineau, Y. (2006) Characterisation and foaming properties of hydrolysates derived from rapeseed isolate, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 49, 40-48.
161. Lambert, N., & Yarwood, J. N. (1992). Engineering legume seed storage proteins. In P. R. Shewry, & S. Guteridge, *Plant protein engineering* (pp. 167±187). London, UK: Cambridge University Press.
162. Lawal, O. S., & Adebawale, K. O. (2004). Effect of acetylation and succinylation on solubility profile, water absorption capacity, oil absorption capacity and emulsifying properties of Mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrate. *Nahrung/Food*, 48, 129–136.
163. Lawal, O., Adebawale, K., Ogunsanwo, B., Sosanwo, O., & Bankole, S. (2005) On the functional properties of globulin and albumin protein fractions and flours of African locust bean (*Parkia biglobosa*). *Food Chemistry*, 92, 681-691.
164. Lawal, O. S., & Adebawale, K. O. (2006). The acylated protein derivatives of *Canavalia ensiformis* (jack bean): A study of functional characteristics. *LWT/ Food Technology*, 39, 918–929.
165. Li Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W. & Liu, J. (2007) Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*, 106, 444–450.
166. Li, C. P., Chen, D., Peng, J., Enomoto, H., Hayashi, Y., Li, C., (2010). Improvement of functional properties of whey soy protein phosphorylated by dry-heating in the presence of pyrophosphate. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 919-925.
167. Li, C. P., Hayashi, Y., Shinohara, H., Ibrahim, H. R., Sugimoto, Y., Kurawaki, J., (2005). Phosphorylation of ovalbumin by dry-heating in the presence of

- pyrophosphate: effect on protein structure and some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4962-4967.
168. Li, C. P., Ibrahim, H. R., Sugimoto, Y., Hatta, H., & Aoki, T. (2004). Improvement of functional properties of egg white protein through phosphorylation by dryheating in the presence of pyrophosphate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5752-5758.
169. Liao, L., Liu, T., Zhao, M., Cui, C., Yuan, B., Tang, S. & Yang, F. (2010). Functional, nutritional and conformational changes from deamidation of wheat gluten with succinic acid and citric acid. *Food Chemistry*, 123, 123–130.
170. Lin, M. J. Y., Humbert, E. S., & Sosulski, F. W. (1974). Certain functional properties of sunflower meal products. *Journal of Food Science*, 39, 368-370.
171. Linares, E., Larre, C., Le Meste, M. & Popineau, Y. (2000) Emulsifying and foaming properties of gluten hydrolysates with an increasing degree of hydrolysis: role of soluble and insoluble fractions. *Cereal Chemistry*, 77, 414-420.
172. Lindsay, M. P., & Skerritt, J. H. (1999). The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure–function perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 247–253.
173. Liu, K. S. (1997) *Soybeans-Chemistry, Technology and Utilization*. Chapman & Hall, New York, USA.
174. Lopez-Bajonero, L.J, Lara-Calderon, P., Galvez-Mariscal, A., Velazques-Arellano, A. & Lopez-Munguia A. (1991) Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *Journal of Food Science* 56(4): 938–942.
175. Lorenze, P.C., Schlimme E. (1997). Pilot studies of the effect of enzymic cross-linking in dairilyling. *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber* 49, 221-227.
176. Lowry, O., Rosenbrough, N., Fair, A. & Randall, R. (1951) Protein measurement with the Folin–phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
177. Lucassen J. (1981) In Anionic surfactants; Lucassen-Reijnders E. H., eds; Marcel Dekker: New York; 217.
178. Lazos E. S. (1986). Nutritional, fatty acid, and oil characteristics of pumpkin and melon seeds. *Journal of Food Science* 4 : 83–87.

179. Lorenzen, P.C. (2007). Effects of varying time/temperature-conditions of pre-heating and enzymatic cross-linking on techno-functional properties of reconstituted dairy ingredients. *Food Research International*, 40, 700–708.
180. Mahmoud, M. I., Malone, W.T. & Cordle, C.T. (1992) Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *Journal of Food Science* 57(5):1223–1229.
181. Mahmoud, M.I. (1994) Physiochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technology* 48(10):89–95.
182. Malabat, C., Sanchez-Vioque, R., Rabiller, C. & Gu guen, J. (2001) Emulsifying and foaming properties of native and chemically modified peptides from the 2S and 12S proteins of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, (3), 235-242.
183. Mandal, S. & Mandal, R.K. (2000) Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering, *Current Science*, 79 (5), 576-587.
184. Mangino E.M. (1994) Protein Interactions in Emulsions: Protein-Lipid Interactions. In Protein functionality in food systems; Hettiarachchy N. S. and R. Z. G., eds; Marcel Dekker: New York,; 147-179.
185. Marcone, F. M., Kakuda Y., & Yada R.Y. (1998a). Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants-I. Isolation - purification and characterization. *Food Chemistry*, 62, 27-47.
186. Marcone, M. F., Kakuda, K., & Yada, R. Y. (1998b). Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants II. Structural characterization. *Food Chemistry*, 63(2), 265-274.
187. Marcone, M. F. (1996). Structure/function relationships among seed protein globulins from mono and dicotyledonous plants. Ph.D. Thesis. University of Guelph, Guelph.
188. Marcone, M. F. (1999). Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S seed globulins. *Food Research International* 32 79-92.
189. Marquie, C., C. Aymard, J. L. Cuq, & S. Guilbert. 1995. Biodegradable Packaging Made from Cottonseed Flour: Formation and Improvement by Chemical

- Treatments with Gossypol, Formaldehyde and Glutaraldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2762-2767.
190. Marquie, C. (2001) Chemical Reactions in Cottoseed Protein Cross-linking by Formaldehyde, Glutaraldehyde, and Glyoxal for the Formation of Protein Films with Enhanced Mechanical Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4676-4681.
191. Marnoch, R. (2004). Production of Mustard Protein Isolates from Ground Oriental Mustard Seed, Master's dissertation., Dept. of Chemical Engineering, University of Toronto.
192. Martin A.H. (2003) Mechanical and conformational aspects of protein layers on water. Ph.D Thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
193. Martinez, K. D., Sanchez, C., Ruiz-Henestrosa, V. P., Rodriguez patino, J.,M. & Pilosof, A.,M.,R. (2007). Effect of limited hydrolysis of soy protein on the interactions with polysaccharides at the air–water interface. *Food Hydrocolloids*, 21, 813–822.
194. Martineza, K.D, Baeza, R.I., Millan, F. & Pilosof A.M.R. (2005) Effect of limited hydrolysis on sunflower protein on the interactions with polysaccharides in foams. *Food Hydrocolloids*, 19, 361-369.
195. Martins, S. I. F. S., W. M. F. Jongen, and M. A. J. S. van Boekel. (2001) A Review of Maillard Reaction in Food and Implications to Kinetic Modelling. *Trends in Food Science and Technology* 11: 364-373.
196. Micard, V., R. Balamri, M. H. Morel, & S. Guilbert. (2000) Properties of Chemically and Physically Treated Wheat Gluten Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2948-2953.
197. Miller. R. & Groninger, H. S. (1976). Functional properties of enzyme modified acylated fish protein derivatives. *Journal of Food Science*, 41, 268-272.
198. Millerd, A., *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1975, **26**, 56–72.
199. Mine, Y., Ma, F. M., Lauriau, S. (2004). Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lyzosome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1088–1094.
200. Mahajan, A. & Dua, S. (1998) Improvement of functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var toria) meal by reducing antinutritional factors employing enzymatic modification. *Food Hydrocolloids*, 12, 349–355.

201. Motoki, M., & Kumazawa, Y. (2000). Recent trends in transglutaminase technology for food processing. *Food Science Technology and Research*, 6, 151–160.
202. Mourgue, M., Baret, R., Renai, J. & Savary, J. (1968) On the euglobulins of gourd seeds (*Cucurbita Mazima Duch.*) *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 162, 1128-1133.
203. Moure, A., Sineiro, J., & Herminia, D. (2001). Extraction and functionality of membrane-concentrated protein from defatted *Rosa rubiginosa* seeds. *Food Chemistry*, 74, 327-339.
204. Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H. & Parajó, J.C. (2006a): Funcionalidad de productos de proteínas de semillas de aceite : A review. *Food Research International*, Vol. 39(9), 945-963.
205. Moure, A., Domínguez, H., & Parajo, J.C. (2006b) Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochemistry*, 41, 447-456.
206. Mizubiti, I. Y., Biondo, O. Jr., Souza, L. W. de Ol., da Silva, R. S. S. F., & Ida, E. I. (2000). Response surface methodology for extraction optimization of pigeon pea protein *Food Chemistry*, 70, 259-265.
207. Morgan, E. (1991). *Chemometrics: experimental design*, New York: John Wiley & Sons (pp. 180-233).
208. Myers, R. H., & Montgomery, D. C. (1995). *Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
209. Naismith, W. E. F. (1955). Ultracentrifuge studies on soya bean protein. *Biochimica Biophysica Acta*, 16, 203-210.
210. Newkirk, R. W., Maenz, D. D., & Classen, H. L. (2003). Oilseed processing for protein recovery and phytin removal. International Patent WO 03043438.
211. Ng, T.B., A. Parkash and W.W. Tso (2002). Purification and characterization of moschins, arginine–glutamate-rich proteins with translation-inhibiting activity from brown pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds, *Protein Expression and Purification*, 26: 9–13.
212. Nielsen, P.M. (1995) Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents. *Food Biotechnology* 9, 119-156.
213. Nio, N., Motoki, M., Takinami, K. (1996) Gelation mechanism of protein solution by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry* 50, 851-855.

214. Nkosi, C.Z., Opoku, A.R., & Terblanche, S.E. (2006). Antioxidative effects of pumpkin seed (*Cucurbita pepo*) protein isolate in CCl<sub>4</sub>-Induced liver injury in low-protein fed rats. *Phytotherapy Research*, 20(11), 935-940.
215. Nonaka M., Toiguchi S., Sakamoto H., Kawajiri H., Soeda T. & Motoki M. (1994) Changes caused by microbial transglutaminase on physical properties of thermally induced soy protein gels. *Food Hydrocoloids* 8, 1-8.
216. Oh, S., Catignani, G.L. & Swaisgood H. (1993) Characteristics of an immobilized form of transglutaminase: A possible increase in substrate specificity by selective interaction with a protein spacer *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 41 (8), 1337–1342.
217. Osborne, T. B. (1914). The proteins of the wheat flour. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 6, 211-214.
218. Panda, T., & Naidu, G. S. N. (1999). Performance of pectolytic enzymes during hydrolysis of pectic substances under assay conditions: a statistical approach. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 116–124.
219. Paraman, I., Hettiarachchy, N. S., & Schaefer, C. (2007). Glycosylation and deamidation of rice endosperm protein for improved solubility and emulsifying properties. *Cereal Chemistry*, 84(6), 593–599.
220. Panyam, D., & Kilara, A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymic modification. *Trends in Food Science and Technology*, 7(4), 120–125.
221. Pearce, K. & Kinsella, J. (1978) Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 26, 716-723.
222. Peričin D. i Radulović, Lj.(2006) Proteini i njihova ekstrakcija iz semena i pogače uljane tikve golice c.c «Olinka», 47. savetovanje Proizvodnja i prerada uljarica, Zbornik radova (169- 174), Herceg Novi, 2006.
223. Peričin, D. Radulović, Lj. Mađarev, S. i Dimić, E.(2007) Bioprocesi za dodatnu vrednost uljanih pogača, *Uljarstvo*, 38, 35-40.
224. Peričin, D., Vaštag, Ž., Mađarev-Popović, S., Radulović-Popović, Lj., Krimer, V. (2009). Proteinski nusproizvodi industrije ulja; Mogućnost primene i novi proizvodi. Zbornik radova, 50. Savetovanje industrije ulja, 22-26. Jun, Herceg Novi, 173-179.

225. Peričin D., Radulović-Popović Lj., Vaštag Ž., Mađarev-Popović S., Trivić S. (2009) Enzymatic hydrolysis of protein isolate from hull-less pumpkin oil cake: Application of response surface methodology, *Food Chemistry*, 115 (753- 757).
226. Peričin D., Krimer V., Trivić S., Radulović Lj. (2009) The distribution of phenolic acids in pumpkin's hull-less seed, skin, oil cake meal, dehulled kernel and hull, *Food Chemistry*, 113 (450-456).
227. Pernollet, J. C., & Mossea , J. (1983). Structure and location of legume and cereal seed storage proteins. In J. Dausssant, J.Mossea, & J. Vaughan. Seed proteins (155-191). London, UK: Junk Publication.
228. Pichl, I. (1976) Seed globulins of various species of cucurbitaceae, *Phytochemistry*, 15, 717-722.
229. Pihlanto Leppala, A. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Science Technology*, 11, 347-356.
230. Pihlanto, A. (2006) Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1306–1314.
231. Pierce. (2001) Crosslinker selection guide. Rockford Illinois Pierce Chemical Company. Available: <http://www.piercenet.com>
232. Pleh M., Kolak I., Dubravec K.D., and Satovic Z. (1998). Sjemenarstvo bundeva. [Squash seed production]. *Sjemenarstvo*15 (1- 2): 43-75.
233. Pizones, V., Carrera, C., Yust, M., Pedroche, J., Millán F. & Rodríguez Patino, J. (2007) Limited enzymatic hydrolysis can improve the interfacial and foaming properties of  $\beta$ -conglycinin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1536–1545.
234. Plietz, P., Zirwer, D., Schlesier, B., Gast, K. & Damaschun, G. (1984) Shape, symmetry, hydration and secondary structure of the legumin from *Vicia faba* in solution. *Biochemical et Biophysical Acta*, 784, 140-146.
235. Pinterits, A., Arntfield, S.D. (2007): Improvement of canola protein gelatio properties through enzymatic modification with transglutaminase. *LWT-Food Science and Technology*, **10**: 1016-1021.
236. Popović S., Lazić V., Popović Lj., Vaštag Ž., Peričin D. (2010). Effect of the addition of pumpkin oil cake to gelatine to produce biodegradable composite films. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(6), 1184-119.

237. Popović, S., Peričin, D., Vaštag, Ž., Popović, Lj., Lazić, V. (2011). Evaluation of edible film-forming ability of pumpkin oil cake; effect of pH and temperature. *Food Hydrocolloids*, 25:3, 470-476.
238. Portyanko, V. A., Sharopova, N. R., & Sozinov, A. A. (1997). Genetic control and polymorphism of some subunits of storage globulin in cultivated oat. *Cytology and Genetics*, 31(4), 20-23.
239. Prins A. (1988) Principles of foam stability. In *Advances in food emulsions and foams*; Dickinson E. and Stainsby G., eds; Elsevier: London, 91-121.
240. Quanhong, L., & Caili, F. (2004). Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food Chemistry*, 92, 701-706.
241. Rai, P., Majumbar, G. C., DasGupta, S., & De, S. (2004). Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 64, 397-403
242. Rhim, J. W., A. Gennadios, A. Handa, C. L. Weller, & M. A. Hanna. 2000. Solubility, Tensile, and Color Properties of Modified Soy Protein Isolate Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 4937-4941.
243. Reiterer E. and Reiterer R. (1994). Pumpkins: of the Fruits, their Seeds and their Oil. *Verlag Brandstatter*, Vienna.
244. Robinson R.G. (1975). Amino acid composition of sunflower and pumpkin seeds. *Agronomy Journal* 61: 541-544.
245. Rosenthal, A., Pyle, D., & Niranjana, K. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 402-420.
246. Rosenthal, A., Pyle, D.L., Niranjana, K., Gilmour, S. & Trinca, L. (2001): Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean. *Enzyme and Microbial Technology* 28, 499-509.
247. Rutkowski, A. & Gwiazda, S. (1986) Functional properties of plant proteins in meat systems. *Food / Nahrung*, 30, 375-381.
248. Rahali, V., Chobert, J. M., Haertle, T., & Gueguen, J. (2000) Emulsification of chemical and enzymatic hydrolysates of  $\beta$ -lactoglobulin: characterization of the peptides adsorbed at the interface. *Nahrung*, 44, 89-95.



249. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans., C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
250. Rodriguez-Nogales, J.M. (2006). Enhancement of transglutaminase-induced protein cross-linking by preheat treatment of cow's milk: a statistical approach. *International Dairy Journal*, 16(1), 26-32.
251. Rossa, P. N., de Sá, E.M., Burin, V.M., Bordignon-Luiz, M.T. (2011) Optimization of microbial transglutaminase activity in ice cream using response surface methodology, *LWT - Food Science and Technology* 44 , 29-34.
252. Sakamoto, H., Kumazava, Y., Motoki, M. (1994). Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. *Journal of Food Science* 59,866-871.
253. Salampessy, J., Philips, M., Seneweera, S., Kailasapathy, K. (2010). Release of anti-microbial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket (*Meuschenia* sp.) insoluble proteins. *Food Chemistry*, 120, 556–560.
254. Sarkar, N.K., Clarke, D.D. & Waelsch, H. (1957) An enzymatically catalyzed incorporation of amines into proteins. *Biochimistry and Biophysic Acta* 25, 451-452.
255. Savolainen, J. (2004). Method for isolation and modification of proteins. United States Patent Number 6,797,810.
256. Schmidl, M.K., Taylor, S.L. & Nordlee J.A.(1994) Use of hydrolysate based products in special medical diets. *Food Technology* 48(10):77–85.
257. Seguro, K., Nio, N., & Motoki, M. (1996) Some characteristics of a microbial protein cross-linked enzyme: Transglutaminase. *Macromolecular Interactions in Food Technology (ACS Symposium Series 650)*, American Chemical Society, 217-280.
258. Serafini-Fracassini, D., Del Duca, S., & Beninati, S. (1995) Plant transglutaminases. *Phytochemistry* 40, 355-365.
259. Siemensma, A. & Kunst, A. (1999) Sports nutrition. The recovery sports drink. *World ofIngredients* , October: 53–56.
260. Siemensma, A.D., Weijer, W.J. & Bak, H.J. (1993) The importance of peptide length in hypoallergenic infant food formulae. *Trends in Food Science and Technology* 4:16–21.

261. Simner, A. K., Nielsen, M. A., & Youngus, C. G. (1980). Production and evaluation of pea protein isolate. Proceedings of the 40<sup>th</sup> Annual Meeting of the Institute of Food Technologist, New Orleans, LA.
262. Shahidi. F. (1995). Role of chemistry and biotechnology in value-added utilization of shellfish processing discards. *Canadian Chemical News*. September issue.
263. Shimada, K., & Matsushita, S. (1980). Relationship between thermocoagulation of proteins and amino acid compositions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(2), 13–17.
264. Sener B., Orhan I., Ozcelik B., Kartal M., Aslan S., Ozbilen G. (2007). Antimicrobial and antiviral activities of two seed oil samples of *Cucurbita pepo* L. and their fatty acid analysis. *Natural Product Communications 2* (4): 395-398.
265. Sikorski, Z. (2006) The role of proteins in food in: *Chemical and Functional Properties of Food Components*, Edited by Zdzislaw E . Sikorski, Third Edition, CRC Press, 129–175.
266. Slizyte, R., Dauksas, E., Falch, E., Storo, I. & Rustad, T. (2005) Characteristic of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-product. *Process Biochemistry*, 40, 2021–2033.
267. Smulders P.A.E. (2000) Formation and stability of emulsions made with proteins and peptides. Ph.D Thesis. Wageningen University, Wageningen (The Netherlands).
268. Snow, J. (2007). Principles of Biochemistry I: Biomolecular Structure. Department of Chemistry & Biochemistry, University of the Sciences in Philadelphia.
269. Suzuki, S., Izawa, Y., Kobayashi, K., Eto, Y., Yamanaka, Y., Kubota, K. & Yokozeki, K. (2000) Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. *Bioscience of Biotechnology and Biochemistry* 64: 2344-2351.
270. Sing, H. (1991). Modification of food proteins by covalent cross linking. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 391-399.
271. Siu, N., Ma, C., Mock, W., & Mine, Y. (2002). Functional properties of oat globulin modified by a calcium-independent microbial transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2666-2672.

272. Suberbie, F., Mendiza´bal, D., & Mendiza´bal, C. (1981). Germination of soybeans and its modifying effects on the quality of full-fat soy flour. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(3), 192–195.
273. Suh, H.J., Whang, J. H., Kim, Y.S., Bae, S.H. & Noh, D. O. (2003). Preparation of angiotensin I-converting enzyme inhibitor from corn gluten. *Process Biochemistry* 38, 1239-1244.
274. Sun, X.D., & Arntfield, S.D. (2011). Gelation properties of salt-extracted pea protein isolate catalyzed by microbial transglutaminase cross-linking. *Food Hydrocolloids*, 25, 25-31.
275. Schwenke, K. D. (2001): Reflections about the functional potential of legume proteins. A review. *Nahrung*, **45**: 377-381.
276. Shyama Sundar, R. & Rajagopal Rao, D. (1982). Acetylated arachins-functional properties. *Lebensm. Wiss. Technol.* 15: 102-104.
277. Surowka, K, Zmudzinski, D., Fik, M., Macura R., Lasocha, W (2004a): New protein preparations from soy flour obtained by limited enzymic hydrolysis of extrudates. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **5**: 225–234.
278. Surowka, K., Zmudzinski, D., Surowka, J. (2004b): Enzymic modification of extruded soy protein concentrates as a method of obtaining new functional food components. *Trends in Food Science & Technology*, **15**: 153–160.
279. Tang, C., Wang, X., & Yang, X. (2009) Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate by various protease and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, 114, 1484-1490.
280. Thorpe, C., Hooper, K.L., Raje, S., Glynn, N.M., Burnside, J., Turi, G.K., & Coppock, D.L. (2002) Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Archives Biochemistry and Biophysic* 405, 1-12.
281. Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., (2005) Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *LWT-Food Science and Technology*, 38, 255–261.
282. Tsumura, K, Kugimya, W., Bando, N., Hiemori, M., & Ogawa, T. (1999) Preparation of hypoallergic soybean protein with processing functionally by selective enzymatic hydrolysis. *Food Science Technology*, 5, 171-175.
283. Teppner H. (2004). Notes on Lagenaria and Cucurbita (*Cucurbitaceae*) – Review and new contribution. *Phyton* 44: 245–308.

284. Tongyi, C., Quanhong, L., Hong, Y. and Nan, L. (2003) Study on the hypoglycemic action of pumpkin seed protein, *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 3: 7-11.
285. Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortíz, G., Betancur-Ancona, D. (2009). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1597–1604.
286. Touati, A., Creuzenet, C. Chobert, J.M. Dufour, E. & Haenle, T. (1992). Solubility and reactivity of caseins and P-lactoglobulin in protic solvents. *J. Prof. Chem.* 11: 613-621.
287. Triveni, R., Shamala, T.R., & Rastogi, N.K. (2001). Optimised production and utilization of exopolysaccharide from *Agobacterium radiobacter*. *Process Biochemistry*, 36, 787-795.
288. Tsai, G.J., Lin, S.M. & Jiang, S.T. (1996) Transglutaminase from *Streptovorticillium ladakanum* and application to minced fish product. *Journal of Food Science* 61, 1234-1238.
289. Turgeon, S.L., Bard, C. & Gauthier, S.F. (1991). Comparaison de trois methods pour la mesure du degre d'hydrolyse de proteines laitieres modifies enzymatiquement. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 24: 14- 18.
290. Tunctork, Y. & Zorba, O. (2006). The effects of enzymatic hydrolysis of casein on apparent yields and stress and some emulsion properties. *Food Hydrocolloids*, 20, 475–482.
291. Ustunol, Z., & B. Mert. 2004. Water Solubility, Mechanical, Barrier, and Thermal Properties of Cross-linked Whey Protein Isolate-based Films. *Journal of Food Science* 69: 129-133.
292. Uzzan, A. (1998). Vegetable protein products from seed. In B. J. F.Hudson, *Developments in Food Proteins* (pp. 73-118). London: Elsevier Applied Science.
293. Van der Ven, C. (2002). Biochemical and functional characterisation of casein and whey protein hydrolysates. A study on the correlations between biochemical and functional properties using multivariate data analysis. Ph.D. thesis Wageningen University, The Netherlands.
294. van Oort, M. (1996) Oxidases in baking. *International Food Ingredients* No. 4, 42-45.

295. van Vliet, T., Martin, A. H., & Bos, M. A. (2002). Gelation and interfacial behaviour of vegetable proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(5–6), 462–468.
296. Vaštag, Ž. (2011) Biološki aktivni enzimski hidrolizati proteina hrane - Razvoj bioprocesa, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
297. Vaštag, Ž., Popović, S., Popović, Lj., Krimer, V., Peričin, D. (2010). Hydrolysis of pumpkin oil cake protein isolate and free radical scavenging activity of hydrolysates; Influence of temperature, enzyme/substrate ratio and time. *Food and Byproducts Processing*, 88(C2-3), 277-282.
298. Vaštag, Ž., Popović, Lj., Popović, S., Krimer, V., Peričin, D. (2011). Production of Enzymatic Hydrolysates with Antioxidant and Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Activity from Pumpkin Oil Cake Protein Isolate. *Food Chemistry*, 124, 1316-1321.
299. Vioque, J. Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche J., Millán, F. (2000): Partially hydrolysed rapeseed protein isolates with improved functional properties. *Journal of American Oil Chemistry Societe*, 77: 447–450.
300. Wagner J.R. and Guéguen J. (1999) Surface functional properties of native, acid-treated and reduced soy glycinin. 2. Emulsifying properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2181-2187.
301. Wako, Y., Ishikawa, S. & Muramoto, K. (1996) Angiotensin I-converting enzyme inhibitors in autolysates of liver and mantle muscle, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60: 1353-1355.
302. Walstra P. (1987) Overview of emulsion and foam stability. In *Food emulsions and foams*; Dickinson E., eds; Royal Society of Chemistry: London,; 242-257.
303. Walstra P. (1996) Emulsion stability. In *Encyclopedia of emulsion technology*; Becher P., eds; Marcel Dekker: New York; 1-62.
304. Walstra P. and Smulders P.A.E. (1997) Making emulsions and foams: An overview. In *Food colloids: Proteins, lipids and polysaccharides*; Dickinson E. and Bergenstahl B., eds; The Royal Society of Chemistry: Cambridge; 367-381.
305. Wang, H. X., & Ng, T. B. (2003). Isolation of cucurmoschin, a novel antifungal peptide abundant in arginine, glutamate and glycine residues from black pumpkin seeds. *Peptides*, 24, 969-972.

306. Wang, X., Tang, Ch., Li, B., Yang, X., Li, L. & Ma, Ch. (2008): Effects of high-pressure treatment on some physicochemical and functional properties of soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, *22* (4), 560-567.
307. Walsh, D.J., Cleary, D., McCarthy, E., Murphy, S., & FitzGerald, R.J. (2003). Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross-linking. *Food Research International*, *36*, 677-683.
308. Weigele, M. Bernardo, S.L., Teng, J.P. & Leimgruber, W. (1972). A novel reagent for the fluorometric assay of primary amines. *Journal of American Chemical Society* *94*: 1125-1132.
309. Whitaker, J.R. (1994) Principles of enzymology for the food sciences, 2 ed.; Marcel Dekker: New York, Vol. 61.
310. Wilde, P.J. & Clark, D.C. (1996) Foam formation and stability. In *Methods in testing protein functionality*; Hall, G.M., Ed.; Blackie Academic & Professional: London, 110-152.
311. Winkler J. (2000). The origin and breeding of hull-less seed Styrian oil-pumpkin varieties in Austria. *Cucurbit Genetics Cooperative* *23*:101–104.
312. Wright, D. J. (1988). Part II. In B. J. F. Hudson, Developments in food proteins. Vol. 6 (pp. 119-178). London: Elsevier Applied Science.
313. Wu, H., Wang, Q, Ma, T., Ren, J. (2009): Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein. *Food Research International*, *42*: 343-348.
314. Wu, J. & Ding, X. (2001) Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *Journal and Agricultural and Food Chemistry* *49*, 501-506.
315. Xia, S.H., Wang, Z., Xu, S.Y. (2007): Characteristics of *Bellamya purificata* snail foot protein and enzymatic hydrolysates, *Food chemistry* **101**:1188–1196.
316. Yamaguchi, S. (2000) Method for cross-linking protein by using enzyme. US 6121013.
317. Yang, L., Paulson, A.T.(2000) Mechanical and water vapor barrier properties of edible gellan films, *Food Research International* *33*, 563-570.
318. Yokoyama, K., Nakamura, N., Saguaro, K. & Kubota, K. (2000) Overproduction of microbial transglutaminase in *Escherichia coli*, *in vitro* refolding,

- and characterization of the refolded form. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 64,1263–1270.
319. Yong, Y. H., Yamaguchi, S., & Matsumura, Y. (2006). Effects of enzymatic deamidation by protein–glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 6034–6040.
320. Yoshie-Stark, Y., Wada Y., & Wäsche (2008): Chemical composition, functional properties, and bioactivities of rapeseed protein isolates. *Food Chemistry* 107, 32-39.
321. You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., & Yang, B. (2009) Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 235-240.
322. Yu, J.M., Ahmedna, M., Goktepe, I. (2007): Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing. *Food Chemistry*, **103**: 121–129.
323. Zarkadas, C. G., H. D. Voldeng, Z. R. Yu, K. Shang, and P. L. Pattison. (1997) Comparison of the Protein Quality of Five New Northern Adapted Natto Soybean Cultivars by Amino Acid Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 2013-2019.
324. Zayas, J. F. (1997). *Functionality of proteins in food*. Berlin: Springer-Verlag.
325. Zhang, K., Li, Y. & Ren, Y. (2007): Research on the phosphorylation of soy protein isolate with sodium tripoly phosphate. *Journal of Food Engineering*, Vol. 76 (4), 1233-1237.
326. Zhao, J., Tian, Z., & Chen, L. (2010). Effects of deamidation on structure and functional properties of barley hordein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58(21), 11448–11455.
327. Zhu, Y., Rinzema, A., Trampr, J. & Bol, J. (1995) Microbial transglutaminase—a review of its production and application in food processing. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44, 277-282.
328. Zhu, K., Zhou, H., Qian, H. (2006): Antioxidant and free radical–scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, **41**: 1296-1302.

329. Živanović I., Vaštag Ž., Popović S., Popović Lj., Peričin D. (2010). Hydrolysis of hull-less pumpkin oil cake protein isolate by pepsin. *International Journal of Biological and Life Science*, 2, 30-34.