

ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST HIDROLIZATA BELANCETA I NJEGOVIH FRAKCIJA DOBIJENIH MEMBRANSKOM ULTRAFILTRACIJOM

M. Žuža¹, A. Gluvić¹, S. Jakovetić¹, N. Luković¹, A. Stefanović¹, J. Jovanović¹, Z. Knežević-Jugović¹

Izvod: Hidrolizom proteina belanceta dobijaju se bioaktivni peptidi koji imaju različita biološka svojstva. U ovom radu korišćena je tehnologija ultrazvuka visokog intenziteta kao pretretman pripreme proteina belanceta koji su zatim hidrolizovani različitim vrstama proteaza u jednostepenom i dvostepenom postupku. Dobijeni hidrolizati su razdvojeni korišćenjem ultrafiltracionih membrana promera 1, 10 i 30 kDa i dobijenim frakcijama je ispitana antioksidativna aktivnost. Među frakcijama veličine manje od 1 kDa koje sadrže bioaktivne peptide, najveću antioksidativnu aktivnost je pokazao ultrazvučno pretretiran hidrolizat nastao delovanjem alkalaza-flevorzima u dvostepenom enzimskom postupku.

Ključne reči: proteini belanceta, ultrazvuk visokog intenzitet, enzimaska hidroliza, membranska ultrafiltracija, antioksidativna aktivnost

Uvod

Belance jajeta je jedno od najkorišćenijih sastojaka hrane, pretežno zbog svojih multifunkcionalnih svojstava, kao što su visoka hranljiva vrednost, penjenje, gelirajuće i emulgacione karakteristike. Utvrđeno je da se hidrolizom proteina belanceta dobijaju bioaktivni peptidi koji imaju različita biološka svojstva, kao što su antibakterijska, antifungalna, antiviralna, antikancerogena, antimutagena, antiinflamatorna, antihipertenzivna i antioksidativna aktivnost (Iametti i sar., 1999.). Bioaktivni peptidi sa antioksidativnom aktivnošću mogu sprečiti oksidacionu lančanu reakciju formirajući stabilne radikale koji ne iniciraju i ne propagiraju oksidaciju lipida ili proteina. Antioksidansi utiču na prevenciju i kontrolu dijabetesa, gojaznosti, hipertenzije, aterosklerotske kardiovaskularne bolesti i neurodegenerativnih bolesti (Plancken i sar., 2003.). Prirodni antioksidansi, kao što su bioaktivni peptidi sa antioksidativnom aktivnošću dobijeni iz hrane, dobijaju sve veći značaj jer su bezbedniji i zdraviji nego sintetski. Ovi peptidi su izolovani iz različitih izvora proteina, kao što su krompir, pirinač, kikiriki, soja, kukuruz, suncokret, uljana repica i belance jajeta (Plancken i sar., 2005.).

Enzimaska hidroliza predstavlja efikasan način za oslobađanje antioksidativnih peptida bez uticaja na njihovu hranljivu vrednost. Do sada je ispitana hidroliza belanceta različitim enzimima kao što su tripsin, himotripsin, papain, pepsin, alkalaza itd.. Antioksidativna svojstva ovih peptida zavise od specifičnosti enzima, stepena

¹Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Karnegijeva 4, Beograd, Srbija (autor za kontakte: mzuza@tmf.bg.ac.rs)

hidrolize, i prirode oslobođenog peptida uključujući molekulska masu, aminokiselinski sastav i hidrofobnost, pa je stoga neophodno optimizovati postupak hidrolize. Većina funkcionalnih karakteristika i ukus belanceta se uništi ili izmeni termičkim pretretmanom koji se koristi za uništavanje patogena (Iametti i sar., 1999.). Stoga, neophodno je razviti alternativni postupak za uništavanje mikroorganizama koji neće negativno delovati na funkcionalna svojstva belanceta. U ovom radu korišćena je tehnologija ultrazvuka visokog intenziteta kao pretretman pripreme proteina belanceta. Pretretirani rastvor belanceta je hidrolizovan različitim vrstama proteaza u jednostepenom i dvostepenom postupku, a potom je dobijeni hidrolizat razdvojen korišćenjem ultrafiltracionih membrana promera 1, 10 i 30 kDa kako bi se dobile frakcije različite molekulske mase. Dobijenim frakcijama je ispitana antioksidativna aktivnost.

Materijal i metode rada

Belanca kokošijih jaja, proteaza iz *Bacillus licheniformis* (alkalaza), proteaza iz *Bacillus amyloliquefaciens* (neutraza), proteaza iz *Aspergillus oryzae* (flavorzim), proteaza iz *Carica papaya* (papain), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Sigma-Aldrich). Svi eksperimenti su rađeni u duplikatu, a prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost dobijenih rezultata.

U laboratorijskoj čaši je odmereno 36,0 g belanceta koje se zatim rastvori destilovanom vodom do 360g (10% rastvor) konstantnim mešanjem do potpune homogenizacije. Dobijen uzorak se stavlja u ultrazvučno kupatilo ispunjeno destilovanom vodom temperature 55°C i tretira ultrazvukom frekvencije 35 kHz 30 minuta (ultrazvučni pretretman) ili se na magnetnoj mešalici uz mešanje greje do 75 °C nakon čega se održava ova temperatura rastvora tokom 30 minuta (termički pretretman). Posle pretretmana, rastvor se hladi do 50 °C, nakon čega se termostatira 20 minuta sa podešenim pH na 8. Nakon isteka 20 minuta dodaje se enzim u rastvor i započinje reakcija hidrolize.

U radu su rađena dva postupka enzimske hidrolize: jednostepeni, sa enzimom alkalaza (proteaza iz *Bacillus licheniformis*) i sa enzimom papain; i dvostepeni postupak u kombinaciji alkalaza-neutraza ili alkalaza-flavorzim.

Proteinskom rastvoru, koji je pretretiran i termostatiran, na 50°C tokom 20 minuta sa podešenom pH=8, dodaje se 750 µl enzima alkalaze kod jednostepenog postupka, dok kod dvostepenog postupka, prvo se dodaje 750 µl enzima alkalaze (proteaza iz *Bacillus licheniformis*) nakon čega se dodaje 750 µl drugog enzima (neutraza/flavorzim) kada se postigne stepen hidrolize od 20%. Pri jednostepenom postupku hidrolize praškastim papainom, belance je neophodno rastvoriti u 50 mM cisteinu, koji je neophodan zbog stvaranja redukcione sredine, a papain se dodaje u praškastom stanju 0,94g.

Tok hidrolize se prati pH stat-metodom uzastupnim merenjem potrošnje rastvora 0,2 M NaOH koji se na 15 minuta dodaje rastvoru za održavanje konstantnog pH 8, i konstantnu temperaturu (50°C) (Knežević-Jugović i sar., 2012.).

Antioksidativna aktivnost uzoraka je merena njihovom sposobnošću da redukuju DPPH radikal, koja se prati padom apsorbance na 517 nm. 200 μ l uzorka je pomešano sa 1800 μ l 0,1 mM rastvora DPPH u metanolu, vorteksirano i ostavljeno na mračno mesto 30 min nakon čega je merena apsorbance na 517 nm.

$$RSA(\%) = \left[1 - \left(\frac{A_s - A_0}{A_b} \right) \right] \cdot 100\% \quad (1)$$

Gde je A_s apsorbance testiranog uzorka, A_0 je apsorbance uzorka u metanolu, i A_b je apsorbance DPPH rastvora bez uzorka.

Membranska separacija je izvedena u čaši za ultrafiltraciju. Za potrebe ovog rada korišćene su membrane izrađene od celuloznog materijala promera 1, 10 i 30 kDa.

U čašu je sipano 45 ml hidrolizata koji se ultrafiltrirao 45 minuta do dobijanje eluenta od oko 7 ml pri pritisku 2 bara inertnog azota. Potom su uzorkovani za dalju bioanalizu i eluent i retentat, dekantovani i odmerena im je zapremina. Uzorkovanje se koristi za određivanje proteina i antioksidativne aktivnosti u frakcijama.

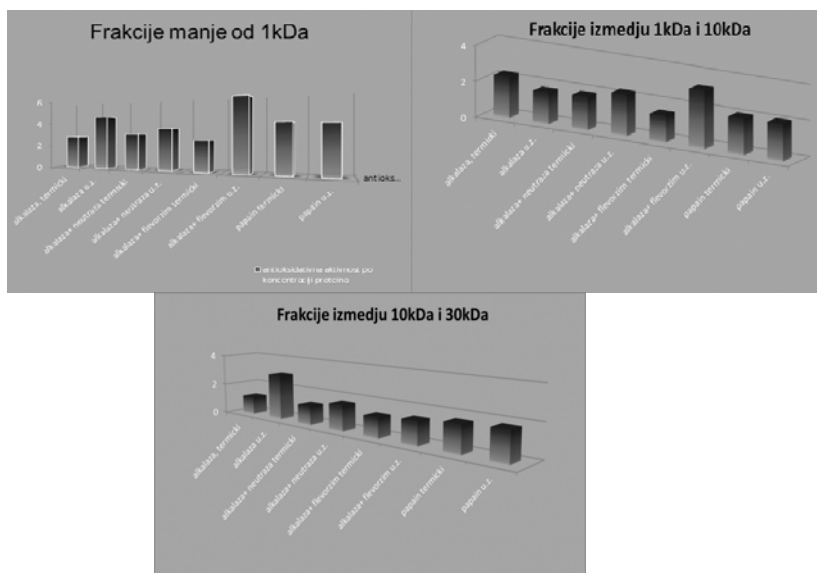
Rezultati istraživanja i diskusija

U ovom radu hidroliza proteina belanceta je zaustavljena na 27% da bi mogla da se porede antioksidativna svojstva hidrolizata dobijenih različitim enzimima. Da bi se razdvojili peptidi korišćena je ultrafiltraciona čaša sa membranom sa tri različite veličine pora od 1, 10 i 30 kDa.

Najinteresantnija frakcija dobijena ultrafiltracijom je frakcija sa proteinima manjim od 10 kDa jer ona sadrži u sebi peptide za koje pretpostavljamo da su bioaktivni.

Među frakcijama veličine manje od 1 kDa koju sačinjavaju kratki peptidi veličine svega nekoliko aminokiselinskih ostataka, najveću antioksidativnu aktivnost je pokazao ultrazvučno pretretiran hidrolizat nastao delovanjem alkalaza-flevozima od dvoenzimskih postupaka, a slede ga jednostepeni postupci nastali delovanjem alkalaze i delovanjem papaina (Slika 1). Na izdvojenim frakcijama može se jasno uočiti značaj korišćenja ultrazvuka kao pretretmana.

Iako termički pretretman pokazuje bolje karakteristike u pogledu brzine enzimske reakcije, rezultati ovih raskidanja ne daju odgovarajuće dužine lanaca ili pak daju proizvod neodgovarajuće konformacije. Manje invazivni tretman ultrazvukom omogućava isti stepen hidrolize kao i pri termičkom postupku, ako hidroliza traje dovoljno dugo, i ujedno dajući željeni oblik proizvoda.



Slika 1. Prikaz procenta antioksidativne aktivnosti hidrolizata izražen po koncentraciji proteina u frakcijama: a) manjim od 1kDa, b) između 1 kDa i 10 kDa, c) između 10 i 30 kDa

Figure 1. Percent of hydrolysates antioxidative activities per protein concentration in the fractions: a) less than 1kDa, b) between 1 kDa and 10 kDa, c) between 10 and 30 kDa

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata može da se zaključi da se korišćenjem ultrazvučnog pretretmana i alkalaza-flavorzima u dvostepenom enzimskom postupku dobija hidrolizat belanceta čiji biokativni peptidi manji od 1 kDa imaju najveću antioksidativnu aktivnost u poređenju sa peptidima dobijenim korišćenjem termičkog pretretmana i alkalaza-neutraleza u dvostepenom i alkalaze i papaina u jednostepenom postupku hidrolize.

Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekta Eureka pod brojem E!6750 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije

Literatura

Iametti S., Donnizzelli E., Pittia P., Rovere P.P., Squarcina N., Bonomi F. (1999). Characterization of High-Pressure-Treated Egg Albumen. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47: 3611-3616.

- Plancken I.V.D., Remoortere M.V., Loey A.V., Hendrickx M.E. (2003). Heat-Induced Changes in the Susceptibility of Egg White Proteins to Enzymatic Hydrolysis: a Kinetic Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 3819-3823.
- Plancken I.V.D., Loey A.V., Hendrickx M.E. (2005). Combined effect of high pressure and temperature on selected properties of egg white proteins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 6: 11–20.
- Kudo K., Onodera S., Takeda Y., Benkeblia N., Shiomi N. (2009). Antioxidative activities of some peptides isolated from hydrolyzed potato protein extract. *Journal of Functional Foods*. 1: 170–176.
- Knežević-Jugović Z.D., Stefanović A.B., Žuža M.G., Milovanović S.L., Jakovetić S.M., Manojlović V.M., Bugarski B.M. (2012). Effects of sonication and high-pressure carbon dioxide processing on enzymatic hydrolysis of egg white proteins. *Acta Periodica Technologica*. 43: 33-41.

ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF EGG WHITE HYDROLYSATES AND THE MEMBRANE ULTRAFILTRATION FRACTIONS

*M. Žuža¹, A. Gluvić¹, S. Jakovetić¹, N. Luković¹, A. Stefanović¹, J. Jovanović¹,
Z. Knežević-Jugović¹*

Abstract

Bioactive peptides with different biological properties can be obtained by egg white proteins hydrolysis. In this study we used the high intensity ultrasound pretreatment of the egg white proteins that were then hydrolyzed by different types of proteases in the one-step and two-step procedure. Membrane ultrafiltration into molecular size of 1 kDa, 10 kDa and 30 kDa was used to separate the obtained hydrolysates and antioxidative activities of obtained fractions were studied. Between fractions less than 1 kDa, containing bioactive peptides, the ultrasound pretreated hydrolysate obtained by using alcalase-*flavorzyme* in a two-stage procedure has shown the highest antioxidant activity.

Key words: egg white proteins, high intensity ultrasound, enzymatic hydrolysis, membrane ultrafiltration, antioxidative activity

¹ University of Belgrade, Faculty of Technology and Metallurgy, Karnegijeva 4, Belgrade, Serbia (corresponding author: mzuza@tmf.bg.ac.rs)