

## EMPIRIJSKI KINETIČKI MODEL HIDROLIZE PROTEINA BELANCETA PRETRETIRANIH ULTRAZVUČNIM TALASIMA VISOKE FREKVENCIJE

J. Jovanović<sup>1</sup>, A. Stefanović<sup>1</sup>, M. Žuža<sup>1</sup>, N. Šekuljica<sup>1</sup>, S. Jakovetić<sup>1</sup>, N. Luković<sup>1</sup>,  
Z. Knežević-Jugović<sup>1</sup>

**Izvod:** U ovom radu ispitan je uticaj koncentracije enzima, supstrata i temperature na početnu brzinu reakcije hidrolize proteina belanceta katalizovane Alkalazom 2,4 L (proteaza iz *Bacillus licheniformis*). Glavni cilj ovog istraživanja bio je ispitivanje uticaja ultrazvučnih talasa na brzinu reakcije hidrolize, kao i modelovanje enzimskog procesa hidrolize proteina belanceta u cilju dobijanja projektnih jednačina neophodnih za projektovanje i dizajn enzimskog reaktora. Kao supstrat korišćen je 10 % w/w rastvor belanceta prethodno tretiran ultrazvučnim talasima frekvencije 35 kHz u toku 30 minuta. Dobijeni eksperimentalni rezultati modelovani su kinetičkim modelom koji uzima u obzir inhibiciju supstratom i deaktivaciju enzima. Predloženi kinetički model dao je dobro slaganje sa dobijenim eksperimentalnim rezultatima. Izračunate kinetičke konstante ukazuju da pretretman ultrazvučnim talasima dovodi do povećanja stepena hidrolize.

**Ključne reči:** proteini belanceta, ultrazvučni pretretman, empirijski kinetički model, enzimska hidroliza

### Uvod

Proteini belanceta poseduju jedinstvene funkcionalne karakteristike, kao što su odlično geliranje, penjenje i aminokiselinski sastav, ali je njihova šira komercijalna primena kao proteinskih dodataka ishrani ograničena zbog velike viskoznosti, alergnosti, nedovoljne digestivnosti i termolabilnosti. Navedena svojstva proteina belanceta značajno se mogu poboljšati kontrolisanom enzimskom hidrolizom, a dobijeni hidrolizati su manje viskozni, lakše se umešavaju, imaju smanjen alergeni potencijal, veću rastvorljivost i značajno su svarljiviji (Knežević-Jugović i sar., 2012.).

Zbog negativnih efekata termičkog pretretmana proteina belanceta, razvoj inovativnih tehnologija i novih metoda koje će poboljšati funkcionalna svojstva proteina belanceta je glavni izazov naučnika danas. Uticaju ultrazvučnih talasa na enzimsku hidrolizu proteina belanceta nije posvećeno dovoljno pažnje u literaturi, ali se njihova primena smatra brzom, efikasnom i pouzdanom tehnikom koja može dovesti do poboljšanja kvaliteta hrane i plasiranja novih proizvoda na tržište sa jedinstvenim funkcionalnim svojstvima (Arzeni i sar., 2012.).

Za utvrđivanje mehanizma i kinetičkog modela reakcije hidrolize proteina belanceta neophodno je uzeti u obzir jednostepenu hidrolizu supstrata, inaktivaciju

<sup>1</sup> Tehnološko-metalurški fakultet, Karnegijeva 4, 11000 Beograd, Srbija (autor za kontakte: mzuza@tmf.bg.ac.rs)

enzima i inhibiciju supstratom u višku ili proizvodima reakcije. Naime, mehanizam je moguće izvesti na osnovu *Michaelis-Menten*-ove jednačine za dobijene eksperimentale rezultate pri različitim početnim koncentracijama enzima i supstrata, kao i pri različitim temperaturama. Pri tome, eksponencijala empirijska jednačina kojom se opisuje hidroliza proteina je  $dh/dt = a \cdot \exp(-bt)$ , dok parametri  $a$  i  $b$  imaju različite izraze u zavisnosti od reakcionih mehanizama (Margot i sar., 1997). Na osnovu prethodnog istraživanja utvrđeno je da reakcioni mehanizam hidrolize proteina belanceta podrazumeva da je reakcija hidrolize nultog reda, a deaktivacija enzima reakcija drugog reda i da u reakcionom sistemu dolazi do inhibicije supstratom (Stefanović i sar., 2013.).

Cilj ovog istraživanja bio je proučavanje uticaja ultrazvučnog pretretmana na enzimsku hidrolizu proteina belanceta i predstavljen je kroz vrednosti dobijenih kinetičkih i termodinamičkih konstanti.

## Materijali i metode rada

### Hidroliza proteina belanceta

Reakcija hidrolize ( $T=50^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=8,0$ ) izvođena je u šaržnom reaktoru sa mehaničim mešanjem pri čemu je kao biokatalizator korišćena nespecifična endopeptidaza iz *Bacillus licheniformis* (Alcalase<sup>®</sup> 2,4L Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ultrazvučni pretretman izveden je u ultrazvučnom kupatilu (BENDELIN electronic, sonorex digitec, Germany) na sobnoj temperaturi. Vodeni 10 % w/w rastvor belanceta (izolovanog iz jejeta nabavljenog u lokalnom supermarketu) bio je izložen ultrazvučnim talasima frekvencije 35 kHz tokom 30 minuta uz konstantno mešanje, nakon čega je uzorak termostatiran 20 minuta na  $50^{\circ}\text{C}$ . Reakcija hidrolize je praćena pH stat metodom, odnosno stalnim dodavanjem odgovarajuće količine 0,2 M rastvora NaOH. Step en hidrolize, SH (%) određivan je prema jednačini (Adler-Nissen, 1986):

$$\text{SH} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} = N_b \times B \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{m_p} \times \frac{1}{h_{\text{tot}}} \times 100$$

gde su:  $h$  - broj ekvivalentnih peptidnih veza hidrolizovanih u trenutku  $t$ ,  $h_{\text{tot}}$  - ukupan broj peptidnih veza u proteinskom supstratu u mmol /g<sub>proteina</sub>,  $B$  - utrošak baze u ml,  $N_b$  - normalitet baze,  $\alpha$  - prosečan stepen disocijacije  $\text{NH}_2$  grupe i  $m_p$  - masa proteina u gramima.

### Kinetika hidrolize proteina belanceta u šaržnom reaktoru

Prilikom ispitivanja odgovarajućeg empirijskog kinetičkog modela hidrolize proteina belanceta, svi eksperimenti su izvođeni pri istim reakcionim uslovima ( $T=50^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=8,0$  i 240 obr/min), u šaržnom reaktoru sa mehaničkim mešanjem koje je ostvareno upotrebom mešalice sa četiri propelera. Početna kinetika reakcije hidrolize ispitana je pri različitim operativnim uslovima variranjem početne koncentracije enzima i početne koncentracije supstrata. Određivanje energije aktivacije i energije deaktivacije

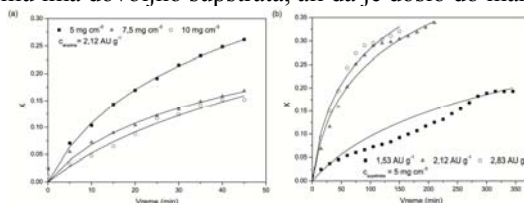
enzima u reakcionom sistemu pri prethodno usvojenim optimalnim koncentracijama enzima i supstrata izvedeno je variranjem temperature reakcije hidrolize.

## Rezultati istraživanja i diskusija

### Uticaj početne koncentracije enzima i supstrata na brzinu reakcije hidrolize

U radu je ispitan uticaj početne koncentracije enzima na brzinu reakcije hidrolize 10 % w/w supstrata (Graf.1a). Određene su početne brzine i na osnovu njih utvrđeno je da se manje od 20 % supstrata hidrolizuje za 45 minuta, što je usvojeno kao početna kinetika pri kojoj je ispitan uticaj koncentracije supstrata (Graf.1b). Na osnovu dobijenih eksperimentalnih rezultata izvodi se zaključak da je sa stanovišta kinetike najveća brzina ostvarena prilikom hidrolize supstrata sa koncentracijom enzima 2,83 AU g<sup>-1</sup>. Ova koncentracija nije usvojena za dalji tok istraživanja, jer je zbog nedostatka supstrata ostvaren manji prinos, dok je najbolji prinos ostvaren sa koncentracijom enzima od 2,12 AU g<sup>-1</sup>. Rezultati prikazani na Grafikonu 1a su u skladu sa literaturnim podacima (Margot i sar., 1997.), odnosno povećanje koncentracije enzima dovodi do povećanja brzine reakcije hidrolize.

Na osnovu krivih dobijenih crtanjem *Lineweaver-Burk* i *Michaelis-Menten*-ovih dijagrama (rezultati nisu prikazani), zaključuje se da do određene vrednosti koncentracije supstrata brzina reakcije raste, a daljim povećanjem koncentracije brzina naglo opada. Ovim je dokazano da je supstrat inhibitor u reakciji hidrolize, odnosno da u sistemu dolazi do kompetitivne reverzibilne inhibicije supstratom. Dodavanjem svežeg enzima u reakcioni sistem došlo je do povećanja stepena hidrolize, što je pokazalo da u sistemu ima dovoljno supstrata, ali da je došlo do inaktivacije enzima.

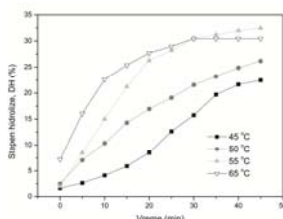


Grafikon 1. Uticaj koncentracije enzima (a) i supstrata (b) na brzinu reakcije hidrolize proteina belanceta (reakcioni uslovi: T=50 °C, pH=8,0, 30 minuta ultrazvučni pretretman 10 % w/w belanceta na 35 kHz).

*Graph 1. The influence of initial enzyme (a) and substrate (b) concentration on the reaction rate of hydrolysis of egg white proteins (reaction conditions: T=50 °C, pH=8.0, 30 min ultrasound pretreatment of 10 % w/w egg white solution at 35 kHz).*

### Uticaj temperature reakcije hidrolize i određivanje termodinamičkih konstanti

Za određivanje energije aktivacije reakcije hidrolize i energije deaktivacije enzima ispitan je uticaj različitih temperatura reakcije (45 °C, 50 °C, 55 °C i 65 °C) pri usvojenim koncentracijama enzima i supstrata (2,12 AU g<sup>-1</sup> i 5 mg cm<sup>-3</sup>).



Grafikon 2. Uticaj temperature na ravnotežni stepen hidrolize (reakcioni uslovi:  $c_{enzima} = 2,12 \text{ AU g}^{-1}$ ,  $c_{supstrata} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $\text{pH}=8,0$ , 30 minuta ultrazvučni pretretman 10 % w/w belanceta na 35 kHz).

Graph 2. The influence of temperature on the equilibrium degree of hydrolysis (reaction conditions:  $c_{enzyme} = 2.12 \text{ AU g}^{-1}$ ,  $c_{substrate} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $\text{pH}=8.0$ , 30 min ultrasound pretreatment of 10 % w/w egg white solution at 35 kHz).

Sa Grafikona 2. se vidi da povećanje temperature reakcije dovodi do povećanja ravnotežnog stepena hidrolize, kao i do povećanja brzine reakcije što se objašnjava činjenicom da se povećava broj molekula supstrata koji imaju dovoljno energije da prevaziđu energetska barijeru i formiraju aktivni kompleks sa enzimom.

Metodom linearne regresije izračunate su kinetičke konstante  $K_i$ ,  $k_2$ ,  $k_d$  i termodinamičke konstante  $E_a$  i  $E_d$ . Njihove vrednosti su prikazane u Tabeli 1.

Tabela 1. Vrednosti kinetičkih i termodinamičkih konstanti reakcije hidrolize  
Table 1. The values of kinetic and thermodynamic constants for proteolytic hydrolysis of egg white proteins

$K_i \text{ (mg cm}^{-3}\text{)}$	$k_2 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$k_d \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$E_a \text{ (kJ mol}^{-1}\text{)}$	$E_d \text{ (kJ mol}^{-1}\text{)}$
268,89	0,0072	0,0494	95,260	119,801

### Zaključak

U radu je ispitan uticaj ultrazvučnih talasa na brzinu enzimske reakcije, i izveden je odgovarajući kinetički model za ovu reakciju. Dobijeni model koji uzima u obzir kompetitivnu reverzibilnu ihibiciju supstratom i deaktivaciju enzima dao je dobro slaganje sa eksperimentalnim rezultatima, stoga se može zaključiti da pretpostavljeni kinetički model adekvatno opisuje mehanizam proteolitičke hidrolize belanceta u šaržnom reaktoru sa mehaničkim mešanjem. Ovim istraživanjem pokazano je da ultrazvučni pretretman dovodi do povećanja stepena hidrolize i brzine reakcije koja je veća oko 1,2 puta u odnosu na reakciju hidrolize bez pretretmana (Stefanović i sar., 2013.).

### Napomena

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

## Literatura

- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier Applied Science publishers, London, UK
- Arzeni, C., Pérez, O. E. Pilosof, A. M. R. (2012). Functionality of egg white proteins as affected by high intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, 29, 308-316.
- Knežević-Jugović, Z., Stefanović, A., Žuža, M., Milovanović, S. Jakovetić, S. Manojlović, V., Bugarski, B. (2012). Effect of sonication and high-pressure carbon dioxide processing on enzymatic hydrolysis of egg white proteins. *Acta Periodica Technologica*, 43, 33-41.
- Margot, A., Flaschel, E. Renken, A. (1997). Empirical kinetic models for tryptic whey-protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 32, 217-223.
- Stefanović, A., Jovanović, J., Gluvić, A., Jakovetić, S., Luković, N., Žuža, M., Knežević-Jugović, Z. (2013). Kinetic model of the hydrolysis of egg white proteins by Alcalase. In: 8<sup>th</sup> International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries. Begrade: Serbian Chemical Society.

### EMPIRICAL KINETIC MODEL FOR EGG WHITE PROTEIN HYDROLYSIS INDUCED BY HIGH-INTENSITY ULTRASOUND PRETREATMENT

*J. Jovanović<sup>1</sup>, A. Stefanović<sup>1</sup>, M. Žuža<sup>1</sup>, N. Šekuljica<sup>1</sup>, S. Jakovetić<sup>1</sup>, N. Luković<sup>1</sup>,  
Z. Knežević-Jugović<sup>1</sup>*

#### Abstract

The subject of this paper was the examination of the influence of enzyme and substrate concentrations and temperature on the initial reaction rate of hydrolysis of the egg white catalyzed with Alcalase 2.4 L (Protease from *Bacillus licheniformis*). The main objective of this paper was investigating the effect of the ultrasound on the reaction rate of hydrolysis and modeling of enzymatic process of hydrolysis of the egg white protein in order to develop the process and design the enzyme reactor. The substrate in this reaction was 10 % w/w solution of egg white pretreated with ultrasound waves the frequency of 35 kHz during 30 min. Proper kinetic model with substrate inhibition and the enzyme inactivation were applied to the results and good congruence between model and experimental data was achieved. The calculated kinetic constants indicate that the ultrasonic pretreatment causes an increase in the degree of hydrolysis of the enzyme reaction.

**Key words:** egg white protein, ultrasound pretreatment, empirical kinetic model, enzymatic hydrolysis

---

<sup>1</sup> Faculty of Technology and Metallurgy, Karnegijeva 4, 11000 Belgrade, Serbia (corresponding author: mzuza@tmf.bg.ac.rs)