

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Ivana V. Gazikalović

ENZIMSKA MODIFIKACIJA PŠENIČNOG
GLUTENA U CILJU SMANJENJA NJEGOVE
ALERGENOSTI I POBOLJŠANJA
FUNKCIONALNIH SVOJSTAVA

doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Ivana V. Gazikalović

ENZYMATIC MODIFICATION OF WHEAT
GLUTEN IN ORDER TO DECREASE ITS
ALLERGENICITY AND IMPROVE ITS
FUNCTIONAL PROPERTIES

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

Mentor:

Dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Članovi komisije:

Dr Dušan Mijin, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Jelena Mijalković, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Maja Vukašinović-Sekulić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Sladana Žilić, naučni savetnik
Institut za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd

Datum odbrane: _____

Izjave zahvalnosti

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, **prof. dr Zorici Knežević-Jugović**, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta, na pruženoj podršci, ukazanom poverenju, nesebično podeljenom znanju i velikoj pomoći tokom izrade ove disertacije. Bilo je jedinstveno iskustvo. Najlepše Vam hvala!

Zahvalnost želim da uputim **prof. dr Dušanu Mijinu**, red. prof Tehnološko-metalurškog fakulteta, na pruženoj pomoći i izdvojenom vremenu prilikom korišćenja jednog od ključnih uređaja neophodnih za izradu ove disertacije. Zahvalnost želim da uputim **prof. dr Maji Vukašinović-Sekulić**, van. prof Tehnološko-metalurškog fakulteta na izdvojenom vremenu i korisnim sugestijama tokom laboratorijskog rada.

Zahvalnost upućujem kolegici **dr. Jeleni Mijalković**, naučnom saradniku Tehnološko-metalurškog fakulteta, za beskrajno strpljenje i angažovanje tokom ove „avanture“. Hvala na podršci, savetima i svom izdvojenom vremenu. Hvala!

Zahvalnost dugujem kolegici **dr. Nataši Šekuljici**, višem naučnom saradniku Inovacionog centra Tehnološko-metalurškog fakulteta. Hvala za svo podeljeno znanje, saradnju, lepe reči i ohrabrenja tokom ovih godina. Hvala!

Kolegici **dr. Neveni Luković**, višem naučnom saradniku Tehnološko-metalurškog fakulteta upućujem zahvalnost za angažovanje tokom eksperimentalnog rada na HPLC-u, ali i za svakodnevnu saradnju i druženje. Zahvalnost upućujem i **dr. Slađani Davidović**, naučnom saradniku Tehnološko-metalurškog fakulteta za svu pomoć i savete tokom rada sa mikrobnim kulturama. Takođe zahvalnost dugujem i **dr. Predragu Petroviću**, naučnom saradniku Inovacionog centra Tehnološko-metalurškog fakulteta za angažovanje tokom eksperimentalnog rada na liofilizatoru i Zetasizer-u čime je u velikoj meri doprineo izradi ove disertacije. Hvala!

Zahvaljujem se i svim ostalim kolegicama i kolegama sa katedre za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju za sve lepe trenutke tokom izrade ove disertacije. Hvala!

Zahvaljujem se **Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije** za ukazanu priliku da budem deo naučne zajednice kao student-doktorand time što su stipendirali moje studije. Zahvaljujem se još jednom prof dr. **Zorici Knežević-Jugović** što mi je kao rukovodilac projekta E!13082 BIOFLOSBAKE-LAVGLU pružila priliku da budem aktivno uključena u projekat i da svojim radom doprinesem realizaciji istog.

Hvala mojim drugaricama koje, možda nisu uvek razumele čime se to bavim u svom naučnom radu, ali koje su uvek bile zainteresovane za moj napredak tokom izrade ove teze.

Hvala mom Đoletu koji je izdržao i preživeo sa mnom slanje dva naučna rada, koji je nesebično pružao podršku tokom ovih godina studiranja.

Posebnu zahvalnost upućujem svojim roditeljima, baki i deki, stricu i ujaku, koji su od samog početka mog školovanja verovali u mene, pružali podršku, izdvajali vreme za sve aktivnosti i najvažnije, radovali se svim mojim uspesima. Najlepše vam hvala!

ENZIMSKA MODIFIKACIJA PŠENIČNOG GLUTENA U CILJU SMANJENJA NJEGOVE ALERGENOSTI I POBOLJŠANJA FUNKCIONALNIH SVOJSTAVA

Sažetak

Proteini glutena spadaju u visokonutritivno vredne proteine koji čine osnovnu hemijsku građu zrna žitarica, kao što su pšenica, raž i ječam. Međutim, ovi proteini odlikuju se visokim sadržajem glutamina i prolamina što ih čini otporne na enzime (Pepsin, Tripsin i Himotripsin) prisutne u digestivnom traktu ljudi. Kao posledica toga, konzumiranjem proizvoda bogatih glutenom obrazuju se velike peptidne frakcije koje iniciraju imunogenu reakciju, čineći tako ovaj protein jednim od najznačajnijih prehrambenih alergena. Upravo naveden problem poslužio je kao polazna osnova za kreiranje cilja ove doktorske disertacije, u kojoj su istraživanja bazirana na primeni enzima kao biokatalizatora prirodnog porekla i nekonvencionalnih termičkih tretmana, poput mikrotalasnog zračenja, zarad proizvodnje i modifikacije nealergenih proteina glutena. Generalno, u okviru ove disertacije pristupilo se definisanju parametara netermičkih postupaka za modifikaciju proteina glutena iz pšenice kakav je mikrotalasno zračenje pod kontrolisanim uslovima u odgovarajućem reaktoru, a sve u cilju smanjenja alergенosti, odnosno sadržaja alergенih epitopa glutena. Osim toga, u cilju smanjenja alergенosti pšeničnog glutena pristupilo se i razvoju biotehnološkog postupka zasnovanog na primeni proteolitičkih enzima velike specifičnosti. Ovaj postupak je optimizovan uz pažljivo definisanje svih važnih procesnih parametara, ali je i upotpunjen i/ili dopunjen kombinovanjem sa mikrotalanim zračenjem. Kao izvor pšeničnog glutena, u okviru eksperimenata, korišćena su dva supstrata:

- prvi, model protein glutena poreklom iz pšenice (bogat frakcijama glutenina i gliadina), i
- drugi, komercijalno dostupna sirovina koja se koristi u svakodnevnoj ishrani ljudi, pšenično belo brašno.

U svakoj fazi eksperimentalnog rada vršena je detaljna karakterizacija modifikovanog pšeničnog glutena, kako model proteina, tako i pšeničnog brašna. Karakterizacija je podrazumevala ispitivanje alergенih svojstava modifikovanih proteina glutena primenom kompetitivnog ELISA testa koji u sebi sadrži R5 monoklonska antitela. Potom, modifikovan gluten je okarakterisan sa aspekta tehnološko-funkcionalnih svojstava (penjenje, emulgovanje, površsko naelektrisanje), strukturnih promena (FTIR analiza, RP-HPLC analiza, SDS-PAGE analiza) i bioaktivnih svojstava (antioksidativna i antimikrobna aktivnost).

Detaljnije, u prvom delu istraživanja ispitan je uticaj parametara mikrotalasnog zračenja na strukturu model proteina glutena poreklom iz pšenice, i njihova alergena svojstva. Delovanjem mikrotalasnog zračenja snage 200 do 800 W, utvrđene su promene u detekciji relativnog sadržaja alergенog epitopa glutena pomoću odabranog antitela. Poređenjem odabranog mikrotalasnog tretmana sa konvencionalnim zagrevanjem, ispitan je uticaj i više različitih temperatura kako bi se bliže odredile promene nastale usled ovih tretmana. Sinergističkim delovanjem enzima kao biokatalizatora, izvršena je kontrolisana hidroliza model proteina glutena nakon mikrotalasnog zračenja. Korišćena je komercijalna endopeptidaza Alkalaza kao biokatalizator za reakciju hidrolize mikrotalasno tretiranog glutena. Primena mikrotalasnog pretretmana snage 200 W pri kontrolisanoj temperaturi u trajanju od svega 1 min, a u kombinaciji sa enzimskom hidrolizom se pokazala kao veoma efikasna, jer su proizvedeni hidrolizati proteina glutena ispoljili izuzetno poboljšanje tehnološko-funkcionalnih svojstava i antioksidativnih aktivnosti u poređenju sa netretiranim glutenom.

Specifični netermalni efekat mikrotalasa je imao uticaj na strukturu i alergенost glutena, usled čijeg dejstva je došlo do unapređenja enzimske hidrolize. Ovo je potvrđeno jer termički tretman glutena pri potpuno istim uslovima je pokazao drugačiji uticaj na strukturu molekula, na osnovu čega se može zaključiti da mikrotaladni tretman rezultuje u jedinstvenim modifikacijama proteina. Opšte je poznato da se usled smanjenja dužine peptidnih lanaca tokom hidrolize menjaju i tehnološko-funkcionalna svojstva proteina. Emulgujuća stabilnost hidrolizata glutena sa i bez pretretmana

značajno je unapređena u odnosu na sirov gluten, međutim do značajnijeg unapređenja među uzorcima nije došlo prilikom ispitivanja stabilnosti formirane pene. Antioksidativna svojstva proizvedenih hidrolizata glutena, pre svega sposobnost neutralizacije radikalskog katjona ABTS^{•+} i DPPH[•] radikala značajno su unapređene u odnosu na polazni uzorak, dok se posebno ističe sposobnost heliranja jona Fe²⁺. S tim u vezi, krajnji hidrolizati sa i bez pretretmana pokazuju značajnu razliku u IC₅₀ vrednostima (mg/ml) prilikom ispitivanja mogućnosti heliranja jona metala. Metodom *dead-end* ultrafiltracije, izvršeno je frakcionisanje krajnjih hidrolizata, mikrotalasno pretretiranog i kontrolnog, na frakcije peptida tačno definisanog opsega molekulskih masa, a u cilju pronalaženja frakcije sa najizraženijom antioksidativnom aktivnošću. Prilikom ispitivanja sposobnosti inhibicije ABTS radikalskog katjona, nisu zabeležene značajne razlike među peptidnim frakcijama. Doprinos peptidne frakcije F3 (3–10 kDa) zabeležen je prilikom testiranja inhibitorne aktivnosti prema DPPH radikalima. Izmerene vrednosti stepena heliranja jona metala značajno se razlikuju među peptidnim frakcijama istog uzorka, ali i među uzorcima. Naime, čak 10–25% veće aktivnosti su zabeležene u slučaju peptidnih frakcija dobijenih od mikrotalasno pretretiranih proteina glutena. Frakcije koje su se posebno istakle su frakcija 2 sa peptidima molekulske mase 10–30 kDa, frakcija 3 (3–10 kDa) i frakcija 4 (1–3 kDa).

U drugom delu istraživanja u okviru ove disertacije, kao sirovina za modifikaciju glutena korišćeno je belo pšenično brašno. Tom prilikom, u cilju modifikacije glutena iz pšeničnog brašna, ali i samog brašna, istraživanja su sprovedena u dva dela. Prvi deo istraživanja je bio baziran na primeni prethodno usvojenih parametara enzimske hidrolize proteazom Alkalazom mikrotalasno pretretiranog glutena, dok je naknadno izvršena studija optimizacije postupka hidrolize pšeničnog brašna u cilju kreiranja valjanog modela koji bi se mogao primeniti u postupku smanjenja alergeničkih svojstava glutena iz brašna. S tim u vezi, prilikom hidrolize proteina brašna varirane su različite koncentracije supstrata u cilju ispitivanja uticaja prisutnih skrobnih materija na sam postupak hidrolize, a potom i na tehno-funkcionalna svojstva dobijenih hidrolizata glutena. Najveće smanjenje sadržaja alergeničkih epitopa glutena zabeleženo je kod uzorka pripremljenog kao 15% (w/w) suspenzija brašna, pri čemu je razlika u alergeničnosti među uzorcima potvrđena razlikom i odsustvom proteinskih traka primenom SDS-PAGE elektroforeze. Emulgujuća svojstva su značajno unapređena postupkom enzimske hidrolize, dok stabilnost formiranih emulzija nije značajno unapređena. Ispitivanjem svojstva penjenja zabeležene su značajne razlike među hidrolizatima, pri čemu je interesantno istaći da se pažljivom kontrolom enzimske hidrolize mogu proizvesti hidrolizati sa dovoljno dugačkim polipeptidnim lancima koji formiraju dobre i stabilne pene. Visoke vrednosti antioksidativnih aktivnosti dobijenih hidrolizata proteina pšeničnog brašna potvrđene su u okviru ABTS i helatnog testa, čineći tako pripremljenje hidrolizata podobne za dalja ispitivanja koja se mogu sprovoditi za potrebe kreiranja preparata sa unapređenim antioksidativnim svojstvima. Sumarno, ovim delom istraživanja evidentno je bilo da prirodno prisustvo skrobnih materija u formiranim suspenzijama ne ometa sam postupak hidrolize, već ga „olakšava“ jer dovodi do sprečavanja formiranja agregata, tj. usled hidratacije sastavnih delova gliadina i glutetina prisustvo skrobnih materija ometa formiranje glutenske mreže čime se olakšava pristup enzima peptidnim vezama i unutrašnjosti supstrata. Naknadnom optimizacijom postupka hidrolize pšeničnog brašna analiziran je uticaj procesnih parametara: pH, temperature, enzim/supstrat (E/S) odnosa i količine supstrata na stepen hidrolize, alergenička svojstva i antioksidativne aktivnosti. Analizom dobijenog modela baziranog na 29 eksperimentalnih tačaka u okviru metode odzivnih površina, zaključeno je da najveći uticaj na tok hidrolize imaju pH, E/S odnos i količina supstrata (S), dok su alergenička svojstva direktno bila uslovljena sa pH i temperaturom procesa. Antioksidativna aktivnost zavisi najviše od primenjenog pH tokom hidrolize i enzim/supstrat odnosa, dok na heliranje dodatno utiče i količina unetog supstrata.

Kako bi se ispitala mogućnost još intenzivnije modifikacije pšeničnog glutena, ali i primene enzimskog preparata Pronaze (endo- i egopeptidazna aktivnost), prevashodno u svrhu smanjenja alergeničkih svojstava, istraživanja su nastavljena u tom smeru. S obzirom na slabu dostupnost literaturnih podataka u vezi delovanja ovog enzima na gluten, ova eksperimentalna postavka je izvedena u cilju teorijskog ispitivanja mogućnosti primene Pronaze kao još jednog preparata kojim

bi se smanjila alergena svojstva glutena. Naime, sa povećanjem postignutog stepena hidrolize zabeleženo je smanjenje alergeni svojstava, unapređene su emulgujuće aktivnosti, dok je kapacitet i stabilnost penjenja obrnuto zavistan od postignutog stepena hidrolize. Suprotno tome, najveći kapacitet i stabilnost penjenja pokazao je uzorak hidrolizata sa najmanjim stepenom hidrolize, usled prisustva polipeptidnih lanaca srednjih molekulskih masa. SDS-PAGE elektroforezom potvrđeno je odsustvo frakcija glutena velikih molekulskih masa (> 50 kDa). Dodatno, razlike i u antioksidativnim svojstvima proizvedenih hidrolizata bile su očigledne. Naime, svi uzorci su pokazali određeni nivo antioksidativne aktivnosti, pri čemu se u odnosu na hidrolizate dobijene Alkalazom, ističe smanjena aktivnost hidrolizata prema jonima Fe^{2+} .

Dobijeni hidrolizat pšeničnog brašna sa najnižim relativnim sadržajem glutena iskorišćen je kako bi se ispitao njegov uticaj na reološke osobine bezglutenskog brašna, heljadinog integralnog brašna, na Miksolabu. Naime dodatkom hidrolizata postignuta je promena reoloških osobina u vidu smanjenja slabljenja glutenske mreže tačnije propadanja proteinske strukture tokom zagrevanja. Dodatak hidrolizata uticao je i na promenu u aktivnosti amilaza, kao i na retrogradaciju skroba u poslednjoj fazi analize.

Sveobuhvatno, sumiranjem rezultata dobijenih tokom istraživanja sprovedenih za potrebe izrade ove disertacije utvrđeno je da se primenom Alkalaze i Pronaze može efikasno i do određene mere smanjiti prisustvo alergeni epitopa u sirovom glutenu koji izazivaju imuni odgovor u osetljivim grupama populacije. Primena mikrotalasnog pretretmana dovodi do strukturnih promena koje su zabeležene u sekundarnoj strukturi proteina glutena, a dodatno pozitivno pospešuju dalji tok enzimske hidrolize. Tokom hidrolize proteina pšeničnog brašna, ustanovljeno je da prisustvo skrobnih granula olakšava postupak enzimske hidrolize jer skrobne granule direktno sprečavaju formiranje proteinskih agregata. Dobijeni hidrolizati proteina pšeničnog brašna se mogu smatrati hidrolizatima bogatim antioksidativnim peptidima, sa unapređenim određenim funkcionalnim svojstvima i smanjenom alergenošću. Stoga, na osnovu svega izloženog moguće je modifikovane proteine glutena uzeti u razmatranje prilikom kreiranja novih proizvoda sa smanjenim alergenim svojstvima. Finalno, kao doprinos istraživanjima u okviru ove disertacije može se pripisati i ekonomičnost mikrotalasnog pretretmana kao i postupka hidrolize u prisustvu skrobnih materija, jer primenom ovakvih postupaka moguće je izvršiti određeni nivo uštede tokom postupka proizvodnje modifikovanih proizvoda glutena sa smanjenim sadržajem alergeni epitopa (~ 20 ppm).

Ključne reči: pšenični gluten, pšenično brašno, mikrotalasno zračenje, enzimska hidroliza, alergnost, funkcionalna svojstva, antioksidativna svojstva

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

ENZYMATIC MODIFICATION OF WHEAT GLUTEN IN ORDER TO DECREASE ITS ALLERGENICITY AND IMPROVE ITS FUNCTIONAL PROPERTIES

Abstract

Gluten proteins belong to highly nutritionally valuable proteins that make up the basic chemical structure of cereal grains, such as wheat, rye and barley. However, these proteins are characterized by a high content of glutamine and prolamin, which makes them resistant to enzymes (Pepsin, Trypsin and Chymotrypsin) present in the human digestive tract. As a consequence, by consuming products rich in gluten proteins, large peptide fractions are formed that initiate an immunogenic reaction, thus making gluten proteins one of the most important food allergens. The problem just mentioned served as the starting point for creating the goal of this doctoral dissertation, in which research is based on the application of enzymes as biocatalysts of natural origin and unconventional thermal treatments, such as microwave radiation, for the production and modification of non-allergenic gluten proteins. In general, within the framework of this dissertation, the parameters of non-thermal procedures for the modification of wheat gluten protein, such as microwave radiation under controlled conditions in a suitable reactor, were defined, all with the aim of reducing allergenicity, i.e. the content of allergenic gluten epitopes. In addition, in order to reduce the allergenicity of wheat gluten, the development of a biotechnological procedure based on the application of highly specific proteolytic enzymes was also undertaken. This procedure was optimized with careful definition of all important process parameters, but it was also completed and/or supplemented by combining it with microwave radiation. As a source of wheat gluten, two substrates were used in the experiments:

- the first, a model of gluten protein originating from wheat (rich in glutenin and gliadin fractions), and
- the second, a commercially available raw material used in the daily diet of people, wheat white flour.

In each phase of the experimental work, a detailed characterization of the modified wheat gluten, both the protein model and wheat flour, was carried out. The characterization involved testing the allergenic properties of modified gluten proteins using a competitive ELISA test that contains R5 monoclonal antibodies. Then, modified gluten was characterized from the spectrum of technological-functional properties (foaming, emulsification, surface charge), structural changes (FTIR analysis, RP-HPLC analysis, SDS-PAGE analysis) and bioactive properties (antioxidant and antimicrobial activity).

In detail, in the first part of the research, the influence of microwave radiation parameters on the structure of model gluten proteins originating from wheat, their allergenic properties, was examined. By the action of microwave radiation with a power of 200 to 800 W, changes in the detection of the relative content of toxic gluten epitopes using the selected antibody were determined. By comparing the selected microwave treatment with conventional heating, the influence of several different temperatures was examined in order to more closely determine the changes caused by these treatments. Through the synergistic action of enzymes as biocatalysts, a controlled hydrolysis of the gluten protein model was performed after microwave irradiation. Commercial endopeptidase Alcalase was used as a biocatalyst for the hydrolysis reaction of microwave-treated gluten. The application of microwave pretreatment with a power of 200 W at a controlled temperature lasting only 1 min, and in combination with enzymatic hydrolysis, proved to be very effective, because the produced gluten protein hydrolysates showed an exceptional improvement in technological-functional and antioxidant activities compared to untreated gluten.

The specific non-thermal effect of microwaves had an impact on the structure and allergenicity of gluten, which resulted in the improvement of enzymatic hydrolysis. This has been confirmed because the thermal treatment of gluten under completely identical conditions has shown a different impact on the molecular structure, from which it can be concluded that microwave treatment results in unique protein modifications. It is generally known that due to the reduction in

the length of peptide chains during hydrolysis, the technological and functional properties of proteins also change. The emulsifying stability of gluten hydrolysate with and without pretreatment was significantly improved compared to raw gluten, however, no significant improvement was noted among the samples when testing the stability of the formed foam. The antioxidant properties of the produced gluten hydrolysates, above all the ability to neutralize the radical cation ABTS^{•+} and the DPPH[•] radical, were significantly improved in comparison to the original sample, while the ability to chelate Fe²⁺ ions is particularly noteworthy. In this regard, the final hydrolysates with and without pretreatment show a significant difference in *IC*₅₀ values (mg/ml) when examining the possibility of metal ion chelation. Using the dead-end ultrafiltration method, fractionation of the final hydrolysates, microwave pretreated and the control, was performed into peptide fractions with a precisely defined range of molecular masses, with the aim of finding the fraction with the most pronounced antioxidant activity. When testing the ability to inhibit the ABTS radical cation, no significant differences were noted among the peptide fractions. The contribution of the peptide fraction F3 (3–10 kDa) was recorded when testing the inhibitory activity against DPPH radicals. The measured values of the degree of chelation of metal ions differ significantly among the peptide fractions of the same sample, but also between samples. Namely, even 10–25% higher activities were recorded in the case of peptide fractions obtained from microwave pretreated gluten proteins. Fractions that stood out in particular were fraction 2 with peptides of molecular weight 10–30 kDa, fraction 3 (3–10 kDa) and fraction 4 (1–3 kDa).

In the second part of the research within this dissertation, white wheat flour was used as a raw material for gluten modification. Therefore, in order to modify the gluten from wheat flour, as well as the flour itself, research was carried out in two parts. The first part of the research was based on the application of previously adopted parameters of enzymatic hydrolysis with protease Alcalase of microwave-pretreated gluten, while a subsequent study was carried out on the optimization of the wheat flour hydrolysis procedure in order to create a valid model that could be applied in the process of reducing the allergenic properties of gluten protein from flour. In this regard, during the hydrolysis of flour, different concentrations of the substrate were varied in order to examine the influence of the present starchy substances on the hydrolysis process itself, and then on the techno-functional properties of the obtained gluten hydrolysates. The greatest reduction in the content of allergenic epitopes of gluten was recorded in the sample prepared as a 15% (w/w) flour suspension, where the difference in allergenicity between the samples was confirmed by the difference and absence of protein bands using SDS-PAGE electrophoresis. The emulsifying properties were significantly improved by the enzymatic hydrolysis procedure, while the stability of the formed emulsions was not significantly improved. Upon examining the foaming properties, significant differences were noted between the hydrolysates, revealing that careful control of enzymatic hydrolysis can yield hydrolysates containing sufficiently long polypeptide chains that form good and stable foams can be produced. The high values of antioxidant activity of the obtained wheat flour hydrolysate were confirmed with the ABTS and chelation test, thus making the preparation of the hydrolysate suitable for further tests that can be carried out for the purposes of creating preparations with improved antioxidant properties. In summary, in this part of the research, it was evident that the natural presence of starchy substances in the formed suspensions does not hinder the hydrolysis process itself, but "facilitates" it because it leads to the prevention of the formation of aggregates, i.e. due to the hydration of the components of gliadin and glutenin, the presence of starchy substances hinders the formation of the gluten network, which facilitates the access of enzymes to peptide bonds and the interior of the substrate. Subsequent optimization of the wheat flour hydrolysis procedure analyzed the influence of process parameters: pH, temperature, enzyme/substrate (E/S) ratio and amount of substrate on the degree of hydrolysis, allergenic properties and antioxidant activity. By analyzing the obtained model based on 29 experimental points within the response surface method, it was concluded that pH, E/S ratio and the amount of substrate (S) have the greatest influence on the hydrolysis process, while the allergenic properties were directly conditioned by the pH and temperature of the process. The antioxidant activity depends mostly on the applied pH during hydrolysis and the

enzyme/substrate ratio, while chelation is additionally influenced by the amount of introduced substrate.

In order to examine the possibility of even more intensive modification of wheat gluten, but also of the application of the Pronase enzyme preparation (endo- and exopeptidase activity), primarily for the purpose of reducing allergenic properties, research was continued in that direction. Considering the poor availability of literature data regarding the action of this enzyme on gluten, this experimental setup was carried out in order to theoretically test the possibility of applying Pronase as another preparation that would reduce the allergenic properties of gluten. Namely, with an increase in the achieved degree of hydrolysis, a decrease in allergenic properties was noted, emulsifying activities improved, while the capacity and stability of foaming are inversely dependent on the achieved degree of hydrolysis. On the contrary, the hydrolysate sample with the lowest degree of hydrolysis exhibited the highest foaming capacity and stability, due to the presence of polypeptide chains with smaller molecular masses. SDS-PAGE electrophoresis confirmed the absence of gluten fractions with large molecular masses (> 50 kDa). Additionally, differences in the antioxidant properties of the produced hydrolysates were also evident. Namely, all the samples showed a certain level of antioxidant activity, where in relation to the hydrolysates obtained by Alcalase, the reduced activities of the hydrolysates towards Fe^{2+} ions stand out.

The obtained hydrolysate of white wheat flour with the lowest relative gluten content was used to examine its influence on the rheological properties of gluten-free flour, whole buckwheat flour, on Mixolab. Namely, with the addition of hydrolysate, a change in rheological properties was achieved in the form of a reduction in the weakening of the gluten network, more precisely, the deterioration of the protein structure during heating. The addition of the hydrolysate also affected the change in amylase activity, as well as the retrogradation of starch in the last phase of the analysis.

Overall, summarizing the results obtained during the research conducted for the purposes of this dissertation, it was established that the use of Alcalase and Pronase can effectively, to a certain extent, reduce the presence of allergenic epitopes in raw gluten, which trigger an immune response in sensitive population groups. The application of microwave pretreatment leads to structural changes that are recorded in the secondary structure of the gluten protein, and additionally positively promotes the further course of enzymatic hydrolysis. During the hydrolysis of wheat flour, it was established that the presence of starch granules facilitates the enzymatic hydrolysis process because the starch granules directly prevent the formation of protein aggregates. The resulting wheat flour hydrolysates can be considered as hydrolysates rich in antioxidant peptides, with improved specific functional properties and reduced allergenicity. Therefore, based on everything presented, it is possible to take modified gluten proteins into consideration when creating new products with reduced allergenic properties. Finally, as a contribution to the research within this dissertation, the economy of microwave pretreatment as well as the hydrolysis procedure in the presence of starch substances can be attributed, because by applying such procedures it is possible to make a certain level of savings during the production process of modified gluten products with a reduced content of allergenic epitopes (~ 20 ppm).

Key words: wheat gluten, wheat flour, microwave radiation, enzymatic hydrolysis, allergenicity, functional properties, antioxidant properties

Scientific field: Technological engineering

Scientific subfield: Biochemical engineering and biotechnology

Sadržaj	
1. Uvod	1
TEORIJSKI DEO	4
2. Enzimski preparati – osnovne karakteristike i primena	4
2.1. Proteaze	4
2.1.1. Primena enzima za smanjenje alergnosti glutena	5
2.1.1.1. Bakterijske prolil–endopeptidaze (PEP)	6
2.1.1.2. Bakterije mlečno-kiselinskog vrenja (LAB)	6
2.1.1.3. Proteolitički enzimi poreklom iz plesni	7
2.1.1.4. Bakterije roda Bacillus – producenti enzima za razgradnju glutena	7
3. Pšenica kao izvor glutena - žitarice koje sadrže gluten	7
3.1. Struktura i sastav pšeničnog zrna	8
3.1.1. Klasifikacija proteina	9
3.1.2. Gluten	9
3.1.3. Intolerancija na gluten i proizvodi sa smanjenom alergenošću	10
4. Imuni odgovor, celijačna i ostale bolesti izazvane unosom glutena	12
4.1. Mehanizam nastanka imunog odgovora i toksični peptidi glutena	12
4.2. ELISA imunotestovi	15
5. Pretretmani glutena i njihove glavne karakteristike	18
5.1. Mikrotalasno zračenje	18
6. Modelovanje procesa i metoda odzivnih površina – Box-Behnken model	20
6.1. Box-Behnken dizajn	22
7. Miksolab analiza	23
7.1. Ispitivanje reoloških osobina testa pomoću Miksolaba	23
8. Eksperimentalni deo	25
8.1. Materijali i instrumenti	25
8.1.1. Materijali - Enzimi i hemikalije	25
8.1.2. Korišćeni instrumenti	27
8.2. Eksperimentalne metode	28
8.2.1. Selekcija i skrining mikroorganizama	28
8.2.2. Submerzna fermentacija	28
8.2.3. Proteolitička aktivnost dobijenog enzimskog preparata	29
8.2.4. Aktivnosti specifičnih proteaza	29
8.2.5. Određivanje sadržaja proteina metodom ukupnog azota – metoda po Kjeldalu	29
8.2.6. Određivanje sadržaja proteina metodom po Loriju (Lowry)	30
8.2.7. Tretman u mikrotalasnom reaktoru	31
8.2.8. Konvencionalni toplotni tretman	32
8.2.9. Enzimaska hidroliza	32

8.2.10. Određivanje kinetičkih parametara reakcije hidrolize proteina glutena-----	34
8.2.11. Kvantifikacija reaktivnih epitopa gliadina -----	34
8.2.12. Određivanje emulgujućih svojstava -----	35
8.2.13. Kapacitet penjenja i stabilnost pene -----	36
8.2.14. Merenje antioksidativne aktivnosti metodom redukcije ABTS radikalskog katjona-----	36
8.2.15. Merenje antioksidativne aktivnosti metodom heliranja jona metala-----	37
8.2.16. Merenje antioksidativne aktivnosti metodom neutralizacije DPPH radikala---	38
8.2.17. Kvantifikacija ukupnih i reaktivnih sulfhidrilnih grupa -----	38
8.2.18. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR) -----	38
8.2.19. SDS-PAGE elektroforeza-----	39
8.2.20. Površinski napon i zeta potencijal -----	40
8.2.21. RP-HPLC analiza -----	40
8.2.22. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti hidrolizata proteina glutena -----	41
8.2.23. Frakcionisanje hidrolizata glutena postupkom ultrafiltracije -----	41
8.2.24. Studija optimizacije postupka hidrolize proteina pšeničnog brašna -----	42
8.2.25. Miksolab analiza -----	43
8.2.26. Statistička obrada eksperimentalnih podataka -----	43
9. Rezultati i diskusija-----	44
9.1. Selekcija proizvodnog mikroorganizma producenta proteaza -----	44
9.1.1.Uticaj sastava podloge na proizvodnju proteaza -----	44
9.1.2.Uticaj pH na proizvodnju i aktivnost proteaza -----	46
9.2. Preliminarni eksperimenti – enzimska hidroliza -----	48
9.2.1.Preliminarne hidrolize glutena-----	48
9.3. Mikrotalasni i toplotni tretman -----	48
9.3.1.Uticaj parametara tretmana na sadržaj alergeni epitopa glutena -----	48
9.4. Enzimska hidroliza i njen uticaj na smanjenje alergeni sadržaja glutena ---	54
9.4.1.Mikrotalasni tretman kao pretretman za enzimsku hidrolizu-----	54
9.4.2.Uticaj prisustva ugljenih hidrata na tok enzimske hidrolize glutena -----	56
9.4.3.Hidroliza Pronazom -----	58
9.5. Strukturne promene -----	59
9.5.1.Uticaj mikrotalasnog tretmana na strukturne promene glutena -----	59
9.5.1.1. FTIR analiza-----	59
9.5.1.2. SDS-PAGE elektroforeza -----	63
9.5.1.3. Agregacione karakteristike proteinskih frakcija glutena-----	64
9.5.1.4. RP-HPLC hromatogrami hidrolizata glutena-----	66
9.5.2.Uticaj delovanja proteolitičkih enzima na strukturne promene proteina glutena prilikom hidrolize komercijalnog pšeničnog brašna-----	66
9.5.2.1. FTIR analiza-----	66

9.5.2.2. SDS-PAGE elektroforeza -----	69
9.5.2.3. Agregacione karakteristike hidrolizata proteina pšeničnog brašna -----	70
9.5.2.4. Profil peptida u hidrolizatima proteina brašna – RP-HPLC hromatografija	71
9.5.3. Strukturne promene u hidrolizatima glutena hidrolizovanih Pronazom -----	72
9.5.3.1. FTIR analiza-----	72
9.5.3.2. SDS-PAGE elektroforeza -----	73
9.5.3.3. Agregacione karakteristike glutena nakon modifikacije Pronazom -----	74
9.5.3.4. RP-HPLC profil hidrolizata glutena -----	75
9.6. Antioksidativna i funkcionalna svojstva proteinskih frakcija glutena modifikovanih enzimskim postupcima i mikrotalasnim tretmanom -----	76
9.6.1. Antioksidativna i funkcionalna svojstva glutena modifikovanog enzimskom hidrolizom sa Alkalazom i mikrotalansim preretmanom -----	76
9.6.1.1. Antioksidativna svojstva frakcija hidrolizata glutena dobijenih ultrafiltracijom -----	80
9.6.2. Antioksidativna i funkcionalna svojstva hidrolizata proteina brašna -----	82
9.6.3. Antioksidativna i funkcionalna svojstva hidrolizata proteina glutena modifikovanih enzimskom hidrolizom u prisustvu Pronaze -----	86
9.7. Antimikrobna svojstva hidrolizata proteina glutena modifikovanih enzimskim postupcima i mikrotalasnim preretmanom -----	89
9.8. Modelovanje enzimske hidrolize primenom Box-Behnken eksperimentalnog plana -----	91
9.8.1. Uticaj ispitanih procesnih parametara na stepen hidrolize pšeničnog brašna -----	93
9.8.2. Uticaj ispitanih procesnih parametara na alergnost pšeničnog brašna -----	94
9.8.3. Uticaj ispitanih procesnih parametara na antoskidativnu aktivnost pšeničnog brašna -----	95
9.9. Miksolab analiza-----	101
9.9.1. Analiza uticaja dodatka hidrolizata proteina brašna na reološke osobine heljdnog integralnog brašna -----	101
10. Zaključak-----	105
11. Literatura-----	110
12. Spisak slika -----	124
13. Spisak tabela-----	127

1. Uvod

Usled porasta populacije koji neosporno prate i sve veći zahtevi u pogledu dostupnosti hrane, pred savremenim granama prehrambene industrije nameću se izazovi zasnovani na pronalaženju alternativnih izvora hrane, hrane bogate visokovrednim proteinima, kao i tehnologijama za njihovu proizvodnju i/ili preradu. Za prevazilaženje ovih izazova, tehnolozi se vrlo često sučavaju sa sledećim mogućnostima: proizvodnje novih prehrambenih proizvoda i dijetetskih suplemenata unapređenih nutritivnih svojstava i kvaliteta, sa jedne strane, a sa druge strane sa smanjenjem troškova proizvodnje u pogledu smanjenja potrošnje energije, vode i naravno hemikalija. Sa druge strane, žitarice kao biljna vrsta zauzimaju veliki udeo u svetskoj agroindustrijskoj proizvodnji, ali i proizvodnji prehrambenih namirnica. U ljudskoj ishrani, žitarice se koriste kao namirnice bogate hranljivim proteinima, poput glutena. Među svim žitaricama, pšenica je treća žitarica po proizvodnji u svetu i to posle pirinča i kukuruza, a druga po proizvodnji za ljudsku ishranu. Tako, pšenično brašno se najčešće primenjuje u proizvodnji pekarskih proizvoda, hlebova i kolača, dok gluten, sačinjen od proteinskih subjedinica gliadina i glutenina, predstavlja najveću proteinsku frakciju među skladišnim proteinima pšeničnog zrna. S obzirom na činjenicu da je glavni nusproizvod u procesima proizvodnje skroba, gluten kao takav se može iskoristiti dalje u različitim proizvodnim procesima u prehrambenoj industriji.

Proteinske subjedinice bogate su aminokiselinama glutaminom i prolinom, čijim prisustvom se obezbeđuje nutritivna vrednost proteina glutena u pogledu količine aminokiselina. Viskoelastična priroda pšeničnog glutena i njegovih subjedinica, glutenina i gliadina, igraju važnu ulogu u procesu pečenja jer povećavaju kapacitet zadržavanja gasa i elastičnost testa čime se poboljšavaju teksturna svojstva hleba. Kvalitet i struktura pečenih proizvoda su upravo povezani sa glutenom. Proteinske frakcije glutena poboljšavaju snagu, rastegljivost, zadržavanje gasova i rok trajanja testa, a takođe poboljšavaju i svojstvo zadržavanja vode u testu (Asrarkulova & Bulushova, 2018). Detaljnije, da bi nastala viskoelastična mreža glutena, prethodno je potrebno izazvati reakciju umrežavanja njegove dve gradivne proteinske subjedinice, u alkoholima rastvorljivih gliadina i u rastvorima kiselina/baza rastvornih glutenina. Jednostavnim dodavanjem vode u proteinsku smešu u kojoj se nalaze gliadini i glutenini, dolazi do formiranja viskoelastične mreže glutena. Gliadini u toj formaciji doprinose viskozitetu i ekstenzibilnosti testa, dok su glutenini odgovorni za jačinu i elastičnost testa.

Prilikom konzumiranja proizvoda bogatih glutenom, vrlo često dolazi do negativnih gastrointestinalnih poremećaja. Gluten, preciznije njegove sastavne komponente se dovode u vezu sa mnogim bolestima i poremećajima u ljudskom organizmu, i mogu se podeliti na: autoimune, alergijske i urođene poremećaje. Dugi peptidni lanci proteina glutena u sebi sadrže epitope koji usled kontakta sa sluzokožom creva izazivaju imuni odgovor. Prema dostupnim podacima iz trenutnih istraživanja, naučna zajednica još uvek u većini smatra da je najbezbednije u potpunosti eliminisati gluten iz upotrebe kako bi se u potpunosti obezbedio izostanak imunog odgovora nakon konzumacije proizvoda koji sadrže gluten. Rezultati istraživanja koja se bave ispitivanjem različitih imunotoksičnih epitopa glutena i njihovog porekla ukazuju na činjenicu da peptidni lanci sa 9 i manje aminokiselina u svom sastavu neometano prolaze kroz digestivni trakt čoveka i istovremeno ne izazivaju imuni odgovor ili bilo kakav vid nelagodnosti.

Usled eliminisanja određenih proizvoda koji u sebi sadrže gluten, potrošači moraju naći zamenski proizvod iz iste kategorije namirnica kako bi održali određeni kvalitet života. U tom pogledu, od industrije se u nekoj meri zahteva da na tržište plasira adekvatne zamenske proizvode istih tehno-funkcionalnih i senzornih svojstava koji će u adekvatnoj meri nadomestiti nedostatak zamenjenog proizvoda sa glutenom. Samim tim se teži ka pronalaženju proizvoda sa velikim sadržajem proteina koji će bez nekog većeg uticaja na cenu i kvalitet finalnog proizvoda nadoknaditi uklonjeni gluten. Trenutno se na tržištu mogu naći proizvodi koji u sebi ne sadrže gluten, i to u vidu hlebova, keksa, preliava i poslastica, koji su označeni kao hrana bez glutena ili „bezglutenski“ proizvodi. Međutim, hrana bez glutena je obično lošijeg kvaliteta u pogledu nutritivnog sastava i senzornih svojstava zbog čega se obogaćuje dodatkom različitih funkcionalnih sastojaka. Naime, proizvođači da bi nadoknadili nedostatak glutena moraju dodati više ugljenih hidrata, masti i aditiva

kako bi finalni proizvod imao tehnološko-funkcionalna svojstva koja pariraju proizvodu iz iste kategorije koji u sebi sadrži gluten. Sam postupak dodavanja aditiva i povećan sadržaj šećera narušava nutritivnu vrednost finalnog proizvoda. Ovim se postupak proizvodnje poskupljuje, dok se nutritivni kvalitet proizvoda narušava. Uprkos savremenim naučnim dostignućima, zamena glutena u proizvodima na bazi žitarica i dalje predstavlja veliki tehnološki izazov. Otuda, u biotehnološkim naučnoistraživačkim i razvojnim centrima i dalje vlada veliki interes za kreiranjem novih funkcionalnih „bezglutenskih“ proizvoda koji bi nutritivno obezbedili potreban unos proteina, ali i pokazali pozitivan uticaj na smanjenje uticaja faktora rizika za razvoj savremenih bolesti.

Pronalaženje i primena različitih biotehnoloških postupaka kao i savremenih netermičkih fizičko-hemijskih postupaka obrade, koji će omogućiti kreiranje proizvoda na bazi pšeničnog glutena sa umanjenom ili potpuno otklonjenom imunoreaktivnosti uz očuvanje nutritivnih i funkcionalnih svojstava, predstavljaju osnovni cilj istraživanja ove doktorske disertacije. Jedan od pristupa podrazumeva razvoj inovativnog biotehnološkog postupka zasnovanog na kreiranju, odabiru, optimizaciji i primeni odgovarajućeg enzimskog preparata u cilju izvođenja procesa hidrolize tj. proteolitičke razgradnje pšeničnog glutena na manje frakcije što bi dovelo do smanjenja alergnog potencijala i unapređenja tehnološko-funkcionalnih svojstva. Smanjenjem dužine peptidnih lanaca u subjedinicama pšeničnog glutena, uspešno bi se smanjio sadržaj imunotoksičnih epitopa i izbegao bi se imuni odgovor koji se javlja u intestinalnom traktu kod osoba intolerantnih na gluten. Ovo bi dalje bilo od značaja za preusmeravanje proizvodnog pristupa hrane bez glutena u pogledu takozvanog prevođenja glutena u nealergen, modifikovan, oblik i njegove primene umesto potpunog eliminisanja glutena iz prehrambenih proizvoda.

Shodno tome, u okviru istraživanja u ovoj disertaciji novoproizvedeni proteolitički enzimi i komercijalno dostupne proteaze primeniće se u dva proteinska sistema, tj. na dva proteinska supstrata. Prva primena podrazumevaće upotrebu proteina sirovog izolovanog pšeničnog glutena, dok će druga primena proteaza biti direktno izvedena na pšeničnom brašnu. Oba postupka će biti izvedena u identično postavljenom šaržnom reaktoru sa mešanjem i kontrolom temperature. Na osnovu podataka o upotrebljenoj količini enzimskog preparata, količine supstrata i operativnih uslova, dobiće se podaci neophodni za definisanje samog postupka. Nakon utvrđivanja optimalnih operativnih uslova na model proteinu, može se otići korak dalje, i ispitati sinergističko dejstvo mikrotalasnog pretretmana i enzimske hidrolize izolovanog glutena iz pšenice.

Potom, ispitaće se mogućnost enzimske hidrolize glutena u prisustvu veće količine čvrstih materija uglavnom skroba (komercijalno pšenično brašno), kako bi se obezbedilo što veće iskorišćenje supstrata i obezbedio ekonomski isplativ postupak. Na osnovu dostupnih literaturnih podataka koji se odnose na ispitivanje proteina glutena, uglavnom se kao polazne sirovine koriste cela zrna pšenice ili brašna, od kojih se umesi testo i formira glutenska mreža, a iz kog se potom kaskadnim hemijskim postupcima izoluju glavne proteinske frakcije glutena (gliadini i glutenini). Tako izolovane frakcije potom se tretiraju određenim odabranim biotehnološkim postupcima.

U okviru ove doktorske disertacije odabran je drugačiji pristup enzimskog tretmana glutena iz pšeničnog brašna, i to tako da se enzimom deluje direktno na sirovo pšenično brašno bez dodatnih koraka koji uključuju upotrebu vode i hemikalija. Važno je istaći da se tokom procesa odvajanja glutena utroše velike količine vode po toni prerađenog brašna, pri čemu se javlja problem uklanjanja i odlaganja tečnog otpada koji u sebi sadrži rastvorne proteine, skrobne materije, šećere i vlakna. Osim problema koji se javlja usled procesa separacije, postoji i problem koji se tiče očuvanja funkcionalnih svojstava glutena. Navlaženi gluten je podložan temperaturnoj denaturaciji pri čemu i niske temperature mogu imati loš uticaj na viskoelastična svojstva. Iako postoje studije koje se bave direktnom enzimskom hidrolizom pšeničnog brašna, fokus takvih istraživanja je na uticaju skroba na sam proces hidrolize, ali ne i na detaljniju karakterizaciju dobijenih hidrolizata glutena (Hardt, Boom, & van der Goot, 2015). Pristupom direktnog delovanja enzima na sirovo brašno, kakav je u ovoj disertaciji, izbeći će se trošenje nepotrebno velikih količina vode neophodne za ispiranje formiranog testa kako bismo izolovali gluten, a potom i hemikalija, što je slučaj u industriji skroba. Na osnovu podataka prikupljenih iz ovih eksperimentalnih analiza, utvrdiće se mogućnost i efikasnost primene enzimskog preparata za hidrolizu brašna u prisustvu skrobnih materija. Pripremljeni hidrolizati

pšeničnog brašna okarakterisaće se u pogledu bioaktivnih svojstava, pre svega antioksidativne aktivnosti, funkcionalnih karakteristika, ali najvažije i u pogledu količine zaostalih imunotoksičnih epitopa.

Treći biotehnološki pristup kreiranju proteina glutena sa smanjenim sadržajem imunotoksičnih epitopa podrazumevaće upotrebu mikrotalasnog zračenja pri kontrolisanim uslovima temperature, intenziteta zračenja i dužine trajanja tretmana. U tu svrhu koristiće se mikrotalasni reaktor, i prevashodno će se ipitati uticaj mikrotalasnog zračenja na smanjenje sadržaja imunotoksičnih epitopa model proteina, pšeničnog glutena. Mikrotalasni tretman koji dovede do najvećeg smanjenja alergnosti pšeničnog glutena odabraće se za dalji rad u sinergiji sa enzimskim postupkom, u vidu pretretmana, kako bi se dodatno uticalo na smanjivanje sadržaja imunotoksičnih epitopa. Delovanjem mikrotalasnog zračenja dolazi do strukturnih promena u proteinu, tačnije dolazi do izmene dostupnih regija na koje enzim može delovati tokom hidrolize, pri čemu dobijeni hidrolizati proteina pokazuju različita svojstva. Na osnovu pregleda dostupnih literaturnih podataka, potvrđeno je da enzimski preparati mogu uspešno smanjiti dužinu peptidnih lanaca proteina glutena, dok je za mikrotalasni tretman pokazano da efikasno deluje na smanjenje detektovane alergnosti.

Tokom poslednje decenije, različite kombinacije postupaka enzimske hidrolize i fizičkih pretretmana glutena i njegovih frakcija su korišćene u cilju proizvodnje proizvoda sa očuvanim tehnološko-funkcionalnim svojstvima (Rai, Kaur, & Chopra, 2018; Yang, et al., 2017; Zhang, Li, Li, Ma, & Zhang, 2018). Što se tiče primene mikrotalasnog tretmana, primena i optimizacija mikrotalasnog zračenja upotrebom mikrotalasnog reaktora predstavljaju dobru alternativu konvencionalnim mikrotalasnim pećnicama koje se mogu naći u domaćinstvu, a koje su inače do sada primenjivane u eksperimentalnim istraživanjima koja su za cilj imala smanjenje alergnog potencijala pšeničnog glutena. Mikrotalasni tretman predstavlja dejstvo elektromagnetnih talasa frekvencije od 300 MHz do 300 GHz koji izazivaju molekularne vibracije. Promene koje nastaju prilikom dejstva ovakvog tipa zračenja, najpre se uočavaju usled preraspodele α -heliksa i β -ploča u sekundarnoj strukturi detektovanoj merenjem FTIR spektara i ukupnih i reaktivnih sulfhidrilnih grupa. Mikrotalasno zračenje izaziva agregaciju i odmotavanje proteina, pri čemu različite snage i vreme izloženosti zračenju imaju različito dejstvo na proteinske frakcije glutena. Primenom prejakog mikrotalasnog zračenja proteinske frakcije glutena su modifikovane u toj meri da im je smanjena ekstraktabilnost usled promena u konformacionoj strukturi. Osim toga, prejako mikrotalasno zračenje negativno utiče i na tehnološko-funkcionalna svojstva proteina. S tim u vezi, u okviru istraživanja ove disertacije ispitaće se različite snage mikrotalasa, u rasponu snaga od 200 do 800 W, kako bi se utvrdio optimalni tretman i vreme izlaganja, a sa ciljem efikasnog smanjenja alergnih svojstava uz očuvanje i/ili unapređivanje njegovih tehnološko-funkcionalnih svojstava.

Hidrolizovani i/ili mikrotalasno tretirani proteini, među njima i proteini glutena, koji imaju izmenjena alergna svojstva takođe ispoljavaju određene biološke aktivnosti (antioksidativna, metaljon helatna, antimikrobna) kao i određene tehnološko-funkcionalne sposobnosti. Sa postupkom hidrolize i smanjenjem alergnosti (skraćivanjem peptidnih lanaca koji u sebi nose imunotoksične epitope) usko je povezano unapređenje funkcionalnih svojstava proteina, rastvorljivost, svarljivost, dok su istovremeno očuvane nutritivne vrednosti. Svim hidrolizatima će se zato ispitati osnovna funkcionalna svojstva, kao što su: kapacitet penjenja i stabilnost pene i svojstva formiranja emulzija i njihove stabilnosti.

Neki od najvažnijih zaključaka ove disertacije odnosiće se na utvrđivanje izvođenja i optimizacije postupka enzimske hidrolize pšeničnog glutena (u formi izolovanog proteina glutena i pšeničnog brašna), na uticaj primenjenog mikrotalasnog pretretmana, na uticaj prisustva skrobnih materija tokom hidrolize, na uticaj mikrotalasnog pretretmana na tok enzimske hidrolize, sve u cilju smanjenja alergnog potencijala glutena i sa aspekta poboljšanja i očuvanja nutritivnih svojstava, bioloških aktivnosti i tehnološko-funkcionalnih svojstava dobijenih peptida. Istraživanja u okviru ove disertacije, a bazirana na prethodno opisanim metodologijama i pristupima, kao rezultat daće predlog za razvoj novog postupka procesa pretretmana i/ili hidrolize glutena, njegove modifikacije, unapređenja svojstava (tehnološko-funkcionalnih i bioloških) i najvažnije bezbedne primene kod osetljivih grupa.

2. Enzimski preparati – osnovne karakteristike i primena

Čovek je koristio enzime direktno i indirektno hiljadama godina. Njihovo otkriće i upotreba dešavali su se slučajnim pronalascima, usvajanjima i kontinualnim adaptacijama. U suštini sami enzimi su se ispoljavali kroz upotrebu različitih mikroorganizama, na primer prilikom nadolaženja testa, tokom fermentacije voćnih sokova ili kroz pretvaranje mleka u sir. Ova rana otkrića su interesantni primeri kako su naši preci opažali i bili kreativni. Danas enzimi imaju široku primenu u raznim oblastima pri čemu potrošač uglavnom nije ni svestan njihovog prisustva (Ratledge & Kristiansen, 2001). Enzimi su posrednici, prirodni katalizatori, u mnogim reakcijama i pomoću njih se mogu izvršiti mnoge biokatalitičke konverzije u raznim granama industrije (farmaceutska, poljoprivredna, prehrambena...). S obzirom na svestranost njihove primene i usled brzog razvoja tehnologije, mnoge industrije su prihvatile upotrebu enzimskih preparata u svojim procesima (Pandey & Ramachandran, 2006). Enzimi su prirodni katalizatori koji svojim prisustvom u reakcionoj smeši ubrzavaju reakciju i pritom iz iste izlaze nepromenjeni. Strukturu enzima čine polipeptidni lanci koji zauzimaju određenu trodimenzionalnu strukturu. Jedna od odlika enzima jeste visoka specifičnost prema određenom supstratu. Svi enzimi karakterišu se optimalnim uslovima delovanja, stoga male promene u pH vrednosti ili temperaturama, ili čak prisustvo nekih inhibirajućih supstanci veoma utiču na njihovu aktivnost. Pre same primene enzima u bilo kojoj grani industrije potrebno je ispitati njegovu bezbednost. To se najpre odnosi na njihovu toksičnost i poreklo. Da bi enzim iz novog mikrobnog soja bio odobren za primenu, moraju mu se ispitati toksikološka svojstva u pogledu sadržaja sekundarnih metabolita kao što su na primer mikotoksini. Enzimi odobreni za upotrebu u prehrambenim proizvodima nose GRAS status (na engl. *Generally Regarded As Safe*) (Furlan & Pant, 2006).

Jedina ekološki prihvatljiva alternativa uobičajenim tretmanima i proizvodnji hrane jeste primena enzima kao prirodnih biokatalizatora. Ovakvi biokatalizatori se koriste u cilju proizvodnje hrane sa unapređenim funkcionalnim i nutritivnim svojstvima na bezbedan način bez upotrebe hemikalija. Nedavna istraživanja su posebno bila usmerena ka primeni proteolitičkih enzima za digestiju proteina (Zhang, He, & Simpson, 2018). Kako bi se postigla maksimalna iskorišćenost enzimskih preparata u novom stranom okruženju, oni se mogu primenom usmerene evolucije formirati tako da odgovaraju potrebama industrije u pogledu temperature, pH vrednosti, specifičnosti i selektivnosti (Wang, Si, & Zhao, 2012). Primena enzima u različitim granama industrije se ogleda u njihovoj neverovatnoj sposobnosti da prevedu sirovinu od interesa u željeni proizvod, a sve to pod blagim reakcionim uslovima i sa većom efikasnošću. Primena enzima u tom pogledu posledično unapređuje samu ekonomiku procesa i utiče na smanjenje otpadnih sirovina (Madhavan, et al., 2021; Husain, 2010). Enzimi se ne smatraju opasnim, predstavljaju „čistu“ tehnologiju za industrijsku primenu dok istovremeno ubrzavaju reakcije i hemijske procese (Madhavan, Sindhu, Binod, Sukumaran, & Pandey, 2017).

2.1. Proteaze

Proteaze su enzimi koji pripadaju klasi 3, hidrolaze, podgrupi 3.4. peptidaze i sposobni su da hidrolizuju peptidnu vezu unutar molekula proteina, pri čemu nastaju proizvodi manje molekulske mase. Ovi enzimi u zavisnosti od mesta delovanja se dele na endo- i egzopeptidaze. Endopeptidaze deluju na unutrašnji deo polipeptidnih lanaca, dok egzopeptidaze deluju na terminalne krajeve polipeptidnih lanaca. U okviru ove podgrupe se peptidaze dalje dele u zavisnosti od funkcionalne grupe, i to na: serinske (EC 3.4.21), cisteinske (EC 3.4.22), aspartamske (EC 3.4.23) i metaloproteaze (EC 3.4.24) (Knežević-Jugović, 2008). Dalja podela ovih enzima se odnosi na pH vrednost pri kojoj su aktivni, i mogu biti podeljeni na kisele, alkalne i neutralne proteaze. Proteaze se mogu dobiti iz više različitih izvora (mikrobni, biljni, životinjski), međutim mikroorganizmi predstavljaju najpoželjniji izvor ovih enzima, iz više razloga. Mikroorganizmi su podložni genetičkim manipulacijama i generalno su veoma adaptabilni. S obzirom da za svoj rast koriste različite izvore

nutrijenata koji sadrže proteine, samim tim su sposobni da produkuju potrebne enzime za njihovu razgradnju. Zbog toga, tržište enzima najvećim delom potiče od mikrobnih izvora (Sandhya, Sumantha, & Pandey, 2006). Broj i raznovrsnost enzima je proporcionalna broju i raznovrsnosti mikroorganizama. Mikroorganizmi su sakupljeni na različitim lokalitetima u kojima vladaju ekstremni uslovi, kao na primer topli izvori vode, arktik, kišne šume i pustinje (Ratledge & Kristiansen, 2001).

2.1.1. Primena enzima za smanjenje alergenosti glutena

Sa napretkom tehnologije takođe je došlo i do napretka u metodama koje se primenjuju za smanjenje alergenosti glutena. Primena enzimskih tehnologija u cilju smanjenja alergenosti glutena predstavlja jednu od obećavajućih mogućnosti (Wieser & Koehler, 2012; Elmalimadi, et al., 2017a; Walter, Wieser, & Koehler, 2015). Na ovaj način, primenom enzima se ciljano deluje na toksične sekvence glutena *in vitro* pre konzumacije. Ovaj pristup je razmatran i sa medicinske tačke gledišta kao potencijalna oralna terapija za celijačnu bolest, gde bi gluten bio hidrolizovan peptidazama koje se već nalaze u gastrointestinalnom traktu pojedinca i samim tim bi imuni odgovor u tankom crevu bio izbegnut (Janssen, et al., 2015). Iako oralna terapija pomoću digestivnih peptidaza predstavlja izuzetno interesantan pristup rešavanju ovog problema, nameću se problemi u vidu tehnoloških poteškoća i to prvenstveno u vidu obezbeđivanja brzog i efikasnog varenja kompleksnih proteinskih struktura koje sadrže imunogene epitope glutena. Neki peptidi koji po svojoj strukturi predstavljaju najimunogenije polipeptidne sekvence (33-mer peptid, poreklom iz α/β -gliadina) su otporni na dejstvo gastrointestinalnih enzima (Wieser & Koehler, Detoxification of Gluten by Means of Enzymatic Treatment, 2012). Nedavna istraživanja su pokazala da određene prolil-endoropeptidaze poreklom iz različitih izvora potencijalno same ili u kombinaciji sa nekim cisteinskim proteazama mogu uspešno delovati na smanjenje alergenosti glutena, međutim još uvek postoji problem direktne primene u gastrointestinalnom traktu (Wieser & Koehler, Detoxification of Gluten by Means of Enzymatic Treatment, 2012; Shan, Marti, Sollid, Gray, & Khosla, 2004; Martinez, et al., 2019). Dejstvo enzima koji potencijalno ima sposobnost delovanja na određene epitope je smanjeno prisustvom drugih sastojaka u hrani. Određene kombinacije kao što su niska pH vrednost i prisustvo enzima Pepsina mogu ometati aktivnost enzima, tačnije smanjiti je, a samim tim produžiti vreme koje je neophodno enzimu da izvrši kompletno uklanjanje toksičnih epitopa i spreči njihov dalji transport ka tankom crevu (Wieser & Koehler, Detoxification of Gluten by Means of Enzymatic Treatment, 2012; Matysiak-Budnik, et al., 2005). U toku su klinička ispitivanja mogućnosti primene unapređenih sintetičkih enzimskih preparata i njihove mikrokapsulacije čija primena bi bila budućnost enzimske terapije (Segura, Ruiz-Carnicer, Sousa, & de Lourdes Moreno, 2021; Ehren, et al., 2009; Osorio, et al., 2020; Lähdeaho, et al., 2014). Međutim, primena komercijalnog enzima Alkalaze (na engl. *Alcalase*[®]) koji ima veću specifičnost omogućava hidrolizu većeg broja peptidnih veza pri odabranim reakcionim uslovima, a time se otvara mogućnost primene još nekih enzima sa većom specifičnošću usled dostupnosti novih epitopa (Kong, Zhou, & Qian, 2007). Primena enzima u *in vitro* postupcima hidrolize glutena ima dodatnih prednosti jer osim uklanjanja glutena primenom enzima se poboljšavaju i rastvorljivost, nutritivna i funkcionalna svojstva (Wieser & Koehler, Detoxification of Gluten by Means of Enzymatic Treatment, 2012; Elmalimadi, et al., 2017a). Postupkom enzimske hidrolize se mogu proizvesti i različiti bioaktivni peptidi različitih funkcionalnih svojstava i bioloških aktivnosti.

Prema trenutnim saznanjima za modifikaciju imunogene frakcije proteina glutena su korišćeni enzimi iz različitih izvora (Tabela 2.1). U slučaju imunodominantnog peptida poreklom iz α/β -gliadina ($\alpha 2$ -gliadin, sa pozicijom sekvence 56–88), poznatijeg kao 33-mer peptid čiji aminokiselinski kod sadrži 33 aminokiseline u svojoj sekvenci (LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF) postoji problem koji se ogleda u velikoj otpornosti na dejstvo proteolitičkih enzima. Ovaj peptid je od posebnog značaja u oblasti izučavanja alergnosti glutena jer u sebi sadrži specifične epitope T-ćelija, i to jednu kopiju PFPQPQLPY, tri kopije PQPQLPYPQ i dve kopije PYPQPQLPY (Shan, et al., 2002; Zamakhchari, et al., 2011). Rana

istraživanja primene enzima u tretmanu glutena u cilju smanjenja alergeni svojstava su rezultovala saznanjima da nakon delovanja enzima kao što su Pepsin i Tripsin, gluten ipak zadržava svoj alergeni potencijal (Frazer, et al., 1959; Bronstein, Haeffner, & Kowlessar, 1966).

Tabela 2.1. Pregled različitih mikrobnih izvora enzima sa sposobnošću da smanje alergeniost glutena.

Poreklo enzima	Vrsta enzima	Izvor
<i>Bacillus sp.</i>	Bakterijska peptidaza	(Stressler, et al., 2015; Socha, Mickowska, Urmínská, & Kačmárová, 2015)
<i>B.subtlis</i> TMF–2	Bakterijska peptidaza	(Jakovetić Tanasković, et al., 2021)
<i>Aspergillus flavus</i> var. <i>oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i>	Fungalne peptidase (AN-PEP)	(Rizzello, et al., 2007; Di Cagno, et al., 2010; Curiel, et al., 2014; Mohan Kumar, Sarabhai, & Prabhasankar, 2019)
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> <i>Lactobacillus alimentarius</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i>	LAB	(De Angelis, et al., 2010; Curiel, et al., 2014)

2.1.1.1. Bakterijske prolil–endopeptidaze (PEP)

Pojam prolil–endopeptidaze (PEP) se prvi put u literaturi pojavljuje u radu Šana i saradnika (Shan et al.) (Shan, et al., 2002). U svom radu izneli su hipotezu da je primenom PEP enzima moguće izvršiti ragradnju 33-mer peptida do nivoa smanjene toksičnosti, čime su otvorili novo poglavlje u primeni enzimskih preparata za smanjenje alergeniost glutena. Nekoliko bakterijskih kultura je korišćeno u istraživanjima. Istraživanje Zamakčari i saradnika (Zamakhchari et. al) je pokazalo da sojevi *Rothia mucilaginos*a i *Rothia aeri*a, izolovani sa dentalnog plaka, imaju sposobnost razgradnje imunogenih peptida. Ovi podaci nisu iznenađujući s obzirom na činjenicu da se u ljudskom organizmu nalazi pregršt mikrobnih kultura koje doprinose opštem zdravlju ljudskog organizma (Zamakhchari, et al., 2011). Istraživanje Streslera i saradnika (Stressler et. al) na izolaciji bakterijskih kultura iz insekata uzgajanih na žitaricama koje sadrže gluten su pokazala da izolovani sojevi *Bacillus licheniformis* i *B. subtilis* imaju sposobnost produkcije ekstracelularnih peptidaza, dovoljno efikasni da redukuju sadržaj glutena u rangu komercijalnog enzima Alkalaze (Stressler, et al., 2015).

2.1.1.2. Bakterije mlečno–kiselinskog vrenja (LAB)

Bakterije mlečno–kiselinskog vrenja se prirodno nalaze u kiselim testima, pri čemu dominiraju bakterije roda *Lactobacillus*. Ove bakterije imaju važnu ulogu u procesu fermentacije kiselih testa. Istraživanje sprovedeno na preko 50 *Lactobacillus* sojeva je pokazalo da ove bakterije poseduju kompleksan sistem proteolitičkih enzima i da mogu biti efikasni u hidrolizi peptida bogatih ostacima prolina (Di Cagno, et al., 2002). Iako su istraživanja pokazala da smeša koja sadrži nekoliko sojeva mlečnih bakterija sa specifičnom aktivnošću ka prolinu deluje pozitivno na hidrolizu toksičnih epitopa glutena, primena istih sojeva pojedinačno nije pokazala isti rezultat. Ovo ukazuje na to da nijedan soj nema mogućnost proizvodnje svih neophodnih proteolitičkih enzima čime bi se zadovoljio uslov efikasne hidrolize glutena (De Angelis, et al., 2006). Kasnija istraživanja su pokazala da je za efikasnu razgradnju 33-mer peptida neophodna smeša od najmanje tri različite prolil–endopeptidaze (PepN, PepX, i PepO) (De Angelis, et al., 2010).

Primena LAB bakterijskih kultura u procesu fermentacije pšeničnog i raženog brašna tokom dužeg vremenskog perioda može smanjiti, ali ne i u potpunosti ukloniti toksične epitope glutena. Iz

tog razloga simultano se primenjuju LAB bakterije i proteolitički enzimi poreklom iz plesni kako bi se u potpunosti eliminisao gluten (Gobbetti, Rizzello, Di Cagno, & De Angelis, 2007).

2.1.1.3. Proteolitički enzimi poreklom iz plesni

Proteaze poreklom iz plesni *A. flavus* var. *oryzae* i *A. niger* su prepoznate kao bezbedne za upotrebu u prehrambenim proizvodima (Scherf, Wieser, & Koehler, 2018; Benucci, et al., 2020). Ispitivanja strukture PEP enzima poreklom iz *A. niger* (AN-PEP) su pokazala da on pripada familiji serinskih proteaza (S28) koje deluju na terminalne veze Pro-X u peptidima, međutim razlika između ovog enzima i ostalih koji se nalaze u istoj familiji jeste u tome što ovaj enzim deluje i na Pro-X veze u proteinima. Ispitivanja aktivnosti AN-PEP su pokazala da je ovaj enzim aktivan u opsegu pH 4,0–6,5 (Miyazono, Kubota, Takahashi, & Tanokura, 2022; Kubota, Tanokura, & Takahashi, 2005; Walter, Wieser, & Koehler, 2014). Imobilisana AN-PEP je u preliminarnim studijama pokazala obećavajući potencijal za primenu u pivarskoj industriji za proizvodnju piva bez glutena (Benucci, et al., 2020). Peptidaza poreklom iz *A. oryzae* (dipeptidil-peptidaza IV) i komercijalno dostupni enzimski preparat Flevorzim (Flavourzyme[®]) se primenjuju u različitim granama industrije, međutim istraživanja su pokazala da primena pojedinačnih enzima u uslovima koji se nalaze u gastrointestinalnom traktu nije efikasna (Ehren, et al., 2009).

U radu Edensa i sar. (Edens et. al) je pokazano da endoproteaza poreklom iz *Aspergillus* sp. ima visoku aktivnost prema ostacima prolina u peptidima polipeptidima ili proteinima. Prednost ovog soja se ogleda u tome što luči enzimski preparat u fermentacionu tečnost koji je otporan na niske pH vrednosti, kao i na dejstvo Pepsina i Tripsina. S obzirom na svoj GRAS status, primena *Aspergillus* sp. se može primeniti u industrijskoj proizvodnji usled ekonomičnosti procesa proizvodnje pomoću mikrobne kulture (International patent Patent No. WO 2005027953, 2005).

2.1.1.4. Bakterije roda *Bacillus* – producenti enzima za razgradnju glutena

Prema klasifikaciji po Bergeju (Bergey) iz 2005. bakterije pripadaju carstvu prokariota. One su najčešće jednoćelijski mikroorganizmi, različitih oblika (koke, bacili, spiralne/savijene). Uticajem spoljne sredine oblik bakterije se može izmeniti čime se otežava njihova identifikacija (Krieg, 2005; Vukašinović-Sekulić, 2013). U rodu *Bacillus* se nalazi veliki broj industrijski značajnih vrsta, što ne iznenađuje s obzirom da se enzimi najvećim delom dobijaju iz mikrobni kultura. Neke od značajnijih vrsta koje su identifikovane kao dobri producenti proteolitičkih enzima koji imaju sposobnost razgradnje proteina glutena na manje toksične frakcije su *B. subtilis*, *B. licheniformis* i *B. thermoproteolyticus* (Socha, Mickowska, Urminska, & Kačmarová, 2015; Stressler, et al., 2015).

3. Pšenica kao izvor glutena - žitarice koje sadrže gluten

Gramineae je familija trava koja je poznata i pod imenom *Poaceae*, a u okviru koje se nalaze različite podfamilije i porodice. Ovoj familiji pripadaju žitarice kao što su pšenica (*Triticum spp.*), raž (*Secale cereale*), ječam (*Hordeum vulgare*) i ovas (*Avena spp.*) (Anderson, Hanna, Peng, & Kryscio, 2000; Thompson, 2000; Glossary of Common and Scientific Names of Plants, 1990). Hrana na bazi žitarica predstavlja osnovu ljudske ishrane već vekovima. Ove žitarice su bogate makronutrijentima kao što su proteini, masti i ugljeni hidrati, koji su neophodni za ljudski rast i održavanje zdravlja (Topping, 2007). Takođe predstavljaju i važan izvor minerala, vitamina i drugih mikronutrijenata esencijalnih za zdravlje čoveka. U ishrani obezbeđuju oko 18% magnezijuma, 35% ugljenih hidrata, 12,5% gvožđa, 20–30% riboflavina i niacina, preko 40% tiamina, i vitamine B6 i B12 (Marston & Welsh, 1980). Ishrana na bazi žitarica, pogotovo na bazi celog zrna žitarice, je opsežnim istraživanjima dovedena u vezu sa smanjenjem rizika od nekoliko hroničnih bolesti kao što su koronarno oboljenje srca, gojaznost, dijabetes tipa II i neke određene vrste raka (Pereira, et al., 2004; Slavin, 2004).

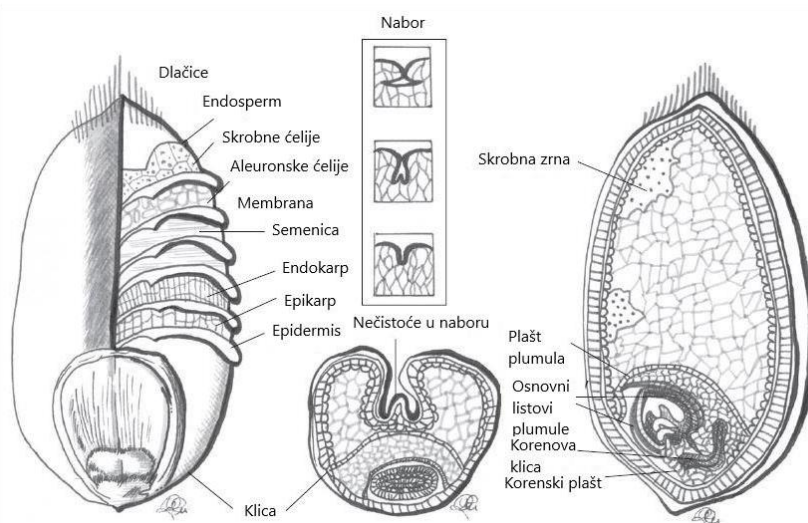
Zrna različitih žitarica, kao na primer pšenica, raž i ječam, se koriste u ljudskoj ishrani jer se u njihovom brašnu nalazi proteinski kompleks gluten, gradivna komponenta mnogobrojnih prehrambenih proizvoda kao što su hleb, testenina, supe i slično (Žilić, 2013). Pšenica predstavlja dakle jednu od glavnih žitarica koje se koriste u ishrani čoveka, i kao takva posledično utiče na nutritivni kvalitet hrane koja se konzumira kao i na zdravlje. Pšenično brašno obiluje visokim sadržajem esencijalnih aminokiselinama, ali i vitaminima, mineralima, vlaknima (Arendt & Zannini, 2013). U Tabeli 3.1 dat je pregled svetske proizvodnje žitarica i proizvodnje u Republici Srbiji, u tonama. Na osnovu podataka prikazanih u tabeli sa sigurnošću možemo tvrditi da je pšenica najzastupljenija žitarica među onima koje u sebi sadrže gluten. Samim tim ona je od velikog značaja za industriju jer se gluten dobija u velikim količinama kao nusproizvod u industriji skroba.

Tabela 3.1. Proizvodnja žitarica (u tonama) u svetu i Srbiji (FAO, FAOSTAT Database 2022, 2022).

Godina proizvodnje	Pšenica		Raž		Ječam		Ovas	
	Svet	Srbija	Svet	Srbija	Svet	Srbija	Svet	Srbija
2014	728,757,761	2,387,202	15,204,159	11,702	145,293,841	323,283	22,747,615	74,932
2015	741,845,269	2,428,203	12,937,204	13,258	147,874,303	362,205	22,558,456	88,288
2016	748,435,124	2,884,537	12,999,190	14,200	146,384,288	395,501	23,298,955	81,344
2017	772,290,608	2,275,623	13,004,048	11,248	148,481,847	305,493	25,333,605	69,538
2018	732,139,584	2,941,601	10,716,767	13,418	139,832,047	410,138	22,592,954	74,707
2019	764,980,821	2,534,643	12,824,590	12,963	158,462,601	373,340	23,132,209	56,242
2020	760,925,831	2,873,503	15,022,273	15,240	157,030,764	490,115	25,181,805	52,135

3.1. Struktura i sastav pšeničnog zrna

Zrno žitarice sačinjeno je od tri glavna dela: omotača, klice i endosperma, pri čemu endosperm čini čak 80–85% ukupne težine žitarice, klica oko 3%, dok ostatak čini omotač (Slika 3.1.1). Omotač je sačinjen od nekoliko slojeva: aleuronskog, hijalinskog, teste, unutrašnjeg i spoljnog perikarpa. U endospermu se nalaze proteini, skrobne materije i veoma malo vlakana. Klica pšeničnog zrna je izvor lipida, antioksidanata, vitamina E i B grupe, minerala i enzima. U omotaču preovlađuju prvenstveno nerastvorna vlakna, rastvorna vlakna u malim količinama, proteini, enzimi, minerali, vitamini E i B grupe, kao i fitinska kiselina (Onipe, Jideani, & Beswa, 2015; Surget & Barron, 2005; Brouns, Hemery, Price, & Anson, 2012). Zrna žitarica predstavljaju važne izvore hranljivih materija, a glavni izvori nutritivnih materija su: proteini (10–15%), skrobne materije (60–70%) i neskrobne materije (3–8%).



Slika 3.1.1. Uzdužni i poprečni presek pšeničnog zrna (izvor i prevedeno na srpski, (Arendt & Zannini, 2013)).

3.1.1. Klasifikacija proteina

Proteine poreklom iz biljaka je prvi put klasifikovao Osborn (Osborne) 1895. godine prema rastvorljivosti proteina u različitim rastvaračima (Osborne, 1895). Biljni proteini se mogu podeliti u četiri grupe:

- 1) rastvorni u vodi – albumini,
- 2) rastvorni u rastvorima soli – globulini,
- 3) rastvorni u razblaženim alkoholima – prolamini i
- 4) rastvorni u kiselim/baznim rastvorima – glutelini.

Albumini i globulini su neglutenski proteini koji se nalaze u endospermu zna pšenice i čine 15-20% ukupnih proteina u zrnu. Oni su bogati aminokiselinama lizin, treonin i alanin (Shewry, et al., 2009). Prolamini predstavljaju glavne rezervne proteine u endospermu pšeničnog zrna, oni su rastvorni u razblaženim rastvorima alkohola. S obzirom da se aminokiseline prolin i glutamin nalaze u velikom procentu u ovoj frakciji, odatle i ime prolamini. U ovoj frakciji se aminokiselina lizin nalazi u veoma malim procentima. Prolamini u različitim žitaricama nose drugačije nazive, a najvažniji su *gliadin* (pšenica), *zein* (kukuruz), *hordein* (ječam), *avenin* (ovas) i *sekalin* (raž) (Rallabhandi, Sharma, Pereira, & Williams, 2015; Eskin & Shahidi, 2012; Preichardt & Gularte, 2013; Haboubi, Taylor, & Jones, 2006). Glutelini, kao poslednja grupa u ovoj podeli, najviše utiču na svojstva testa tokom pečenja i njegovu elastičnost. Ova frakcija u pšeničnom zrnu nosi naziv *glutenini*.

3.1.2. Gluten

Jedinstvena svojstva pšeničnog brašna počivaju na skladišnim proteinima u endospermu pšeničnog zrna (Delcour, et al., 2012). Gluten čini 80–85% ukupnog sadržaja proteina u pšeničnom zrnu, dok preostalih 15-20% proteina pripada neglutenskoj frakciji (Arendt & Zannini, 2013). Prema međunarodnom standardu (*Codex Alimentarius*) gluten je definisan kao „proteinska frakcija pešenice, raži, ječma i ova ili njihovih ukrštenih sorti i derivata, na koje su neke osobe intolerantne i koja je nerastvorna u vodi i 0,5 M rastvoru natrijum-hlorida“ (World Health Organization, 2015). S obzirom da je nerastvoran u vodi, gluten je definisan i kao gumasta masa koja zaostaje nakon ispiranja formiranog pšeničnog testa, pri čemu se uklanjaju skrobne granule i ostali u vodi rastvorljivi sastojci. U zavisnosti od temeljnosti ispiranja, preostala suva čvrsta materija obično sadrži 75–85% proteina i 5–10% lipida, dok ostatak čine uglavnom skrobni i neskrobni ugljeni hidrati (Wieser H., 2007). Stotine proteinskih komponenti prisutnih ili u obliku monomera ili u obliku polimera/oligomera povezanih intramolekulskim disulfidnim vezama čine gluten (Wrigley & Bietz, 1988). Gluten iz pšenice predstavlja glavni skladišni protein zrna pšenice i sastoji se od dve frakcije: gliadina i glutenina. S obzirom da je veoma dostupan na tržištu kao nusprodukt industrije skroba i zbog svojih jedinstvenih visko-elastičnih svojstava ima važnu ulogu u pekarskoj i prehrambenoj procesnoj industriji (Kong, Zhou, & Qian, 2007; Mohan Kumar, Sarabhai, & Prabhasankar, 2019). Obe frakcije su, kao što je već spomenuto, bogate aminokiselinama glutamin i prolin, međutim one se razlikuju po aminokiselinskom sastavu, rastvorljivosti i drugim osobinama. Sačinjene su od više od 60 različitih polipeptida sa molekulskim masama u opsegu 30–90 kDa. Gliadini (prolamini) su prisutni kao monomerni lanci, rastvorni u razblaženim rastvorima alkohola (na primer 60% rastvor etanola). Sa druge strane, glutenini (glutelini) su prisutni u vidu proteinskih agregata povezanih intermolekulskim disulfidnim vezama i hidrofobnim interakcijama. Oni su delimično rastvorljivi u razblaženim rastvorima baza i kiselina (Scherf, Koehler, & Wieser, 2016). Gliadini i glutenini se razlikuju po funkciji koju obavljaju prilikom formiranja testa i njegovog ponašanja. Gliadini doprinose viskozitetu i ekstenzibilnosti (rastegljivosti) sistema, dok glutenini utiču na jačinu (čvrstoću) testa i njegovu elastičnost (Wieser H., 2007). Gliadini i glutenini se mogu bliže podeliti u nekoliko grupa na osnovu molekulske mase (Wieser H., Detection of gluten, 2008).

Tri glavne grupe su sledeće:

- 1) proteini velike molekulske mase (na engl. High Molecular Weight, HMW) – HMW-glutenin subjedinice, α - i γ -tip, molekulskih masa 70–90 kDa,
- 2) proteini srednje molekulske mase (na engl. Medium Molecular Weight, MMW) – ω 5- and ω 1,2-gliadini, molekulskih masa 40–50 kDa,
- 3) proteini male molekulske mase (na engl. Low Molecular Weight, LMW) – α/β - i γ -gliadini, LMW-glutenin subjedinice, molekulskih masa 30–40 kDa.

Ševri (Shewry) i saradnici (Shewry, Tatham, Forde, Kreis, & Mifflin, 1986) su u svom radu dali još detaljniju podelu proteinskih komponenti glutena, i to na osnovu sadržaja aminokiselina koje sadrže sumpor. Na osnovu rezultata istraživanja, poznato je da ω -gliadini sadrže u velikoj količini aminokiseline prolin, glutamin, fenilalanin, a veoma malo ili skoro uopšte ne sadrže cistein i metionin u kojima se nalazi sumpor. Ova frakcija je S-siromašna. α/β -, γ -gliadini i LMW-glutenin subjedinice sadrže manje prolina, glutamina i fenilalanina, ali više cisteina i metionina, što ih svrstava u grupu bogatu sumporom (S-bogata). Osim toga, proteini su izgrađeni od različitih aminokiselina u zavisnosti od toga kojoj grupi pripadaju na osnovu vrednosti molekulske mase (Wieser H. , 2008; Wieser & Koehler, 2012). U **Tabeli 3.2** dat je pregled različitih vrsta peptida na osnovu njihove molekulske mase i učestanosti pojavljivanja.

Tabela 3.2. Ponavljajući segmenti u različitim frakcijama peptida glutena i njihove molekulske mase.

Tip peptida	Ponavljajući segment (učestanost) ^a	Molekulska masa ^b
HMW-GS x-tip	QQPGQG (72x)	60–90 000
HMW-GS y-tip	QQPGQG (50x)	
ω5-gliadin	(Q)QQQFP (65x)	30–75 000
ω1,2-gliadin	(QP)QQPFP (42x)	
α/β	QPQPFPPQQPYP (5x)	30–45 000
γ-gliadin	(Q)QPQQPFP (15x)	
LMW-GS	(Q)QQPPFS (11x)	30–45/75 000

a) (Wieser & Koehler, 2008), b) (Shewry & Halford, 2002)

3.1.3. Intolerancija na gluten i proizvodi sa smanjenom alergenošću

Gluten iz pšenice primarno određuje svojstva testa, takođe se primenjuje u proizvodnji i obogaćivanju prehrambenih proizvoda promenom reoloških, teksturnih i organoleptičkih svojstava krajnjih proizvoda. Primenom određenih enzimskih i hemijskih procesa za modifikaciju glutena moguće je proširiti paletu proizvoda u kojima se tako obrađena sirovina može bezbedno primeniti sa poboljšanim nutritivnim i funkcionalnim svojstvima (Cappelli, Oliva, & Cini, 2020; Pourmohammadi & Abedi, 2021; Fucinos, et al., 2019). S obzirom na to da proteini glutena sadrže veliki broj ostataka prolina, to ih čini teško svarljivim i kao posledica se javlja imuni odgovor kod određene grupe ljudi osetljive na gluten (Hausch, Shan, Santiago, Gray, & Khosla, 2002). S obzirom na široku rasprostranjenost u prehrambenim proizvodima, gluten je veoma često glavni uzročnik hipersenzitivnih reakcija kod dece. Neke od tih reakcija mogu biti: alergije na hranu, astma povezana sa vežbanjem i konzumiranjem hrane, anafilaksa, pekarska astma, celijačna bolest, dermatitis herpetiformis i druge, a kao glavni uzročnici se navode ω 5-gliadin, α -gliadin, γ -gliadin i LMW-glutenin (Georgiev & Dekova, 2011; Sapone, et al., 2012).

Celijačna bolest (na engl. *Celiac Disease*, CD) predstavlja hronični problem tokom digestije i nedostatke u ishrani pojedinca. Ova bolest predstavlja upalni proces gornjeg dela tankog creva izazvana unosom hrane koja u sebi sadrži čak i male količine glutena. Ovo stanje je hroničnog tipa, a trenutno jedini poznati efektivni tretman ovog upalnog procesa jeste potpuno isključivanje hrane iz

ishrane koja u sebi sadrži gluten. Pojedinci koji boluju od celijačne bolesti pred sobom imaju veliki izazov da pronađu hranu bezbednu za konzumaciju, s obzirom da je gluten veoma zastupljen u prehrambenoj industriji (Scherf, Koehler, & Wieser, 2016; Allred & Ritter, 2010). Ishrana bez glutena takođe podrazumeva konzumiranje proizvoda u kojima se prirodno ne nalazi gluten, i upotrebu hrane bogate skrobom (pirinač, krompir i slično) (Ciacci, et al., 2015). U fokusu mnogih istraživanja koja se bave mehanizmom celijačne bolesti jeste postupak za modifikaciju alergene strukture proteina glutena na način na koji imuni sistem više neće moći da je prepozna i samim tim pruži imuni odgovor (Georgiev & Dekova, 2011). Stoga, naučna zajednica koja se bavi tehnologijom hrane već nekoliko decenija unazad traga za primenljivim rešenjem i procesnom tehnologijom pomoću koje bi se efikasno uklonili „toksični” epitopi glutena i slične proteinske sekvence u sirovim materijalima i prehrambenim proizvodima (Huang, Hsu, Yang, & Wang, 2014). Treba istaći da se uklanjanjem glutena iz ishrane obolelih smanjuje broj visokokvalitetnih namirnica. Uklanjanjem glutena se narušavaju tehnološko-funkcionalna svojstva namirnica, osim toga, dodaci u vidu masti, ugljenih hidrata i soli su neophodni kako bi se nadomestili gubici u teksturnim i senzornim svojstvima (Scherf, Wieser, & Koehler, 2018). Uprkos svemu, gluten svojim ekonomskim značajem i funkcionalnim svojstvima višestruko nadmašuje proteine poreklom iz soje ili mleka (Georgiev & Dekova, 2011).

Zbog svojih svojstava koja utiču na kvalitet testa, gluten se nalazi u proizvodima kao što su kolači, testenine, peciva i slično. Osim toga, on se može nalaziti u proizvodima u kojima ne bismo očekivali, i to u mesnim prerađevinama, ribljim proizvodima, vegetarijanskim zamenama za meso, kao zgušnjivač i emulgator u slatkišima, začinima, prelivima za salate i slično. Gluten se dodaje u pekarske proizvode koji se prave od brašna sa niskim sadržajem proteina kako bi se poboljšala svojstva krajnjeg proizvoda (Biesiekierski, 2017). Umesto pšenice, ječma, raži i ovsu u ishrani se mogu koristiti neke druge žitarice koje ne sadrže gluten. Neke od njih su heljda, amarant, kesten, kukuruz, krompir, kinoa, pirinač, soja i mnoge druge (Ciacci, et al., 2015).

Prilikom konzumiranja proizvoda koji sadrže gluten važno je istaći da je neophodno da peptidni lanac sastavljen od najviše devet aminokiselina dođe do tankog creva kako bi se izbegao imuni odgovor (Sollid, Qiao, Anderson, Gianfrani, & Koning, 2012). U cilju određivanja količine prisutnog glutena u namirnicama razvijeni su različiti imunotestovi koji sadrže specifična antitela (Allred & Ritter, 2010). Prema propisima međunarodne zajednice neophodno je da prehrambeni proizvod sadrži manje od 20 mg/kg (20 ppm) glutena kako bi se mogao smatrati bezbednim za konzumiranje i obeležen sa oznakom „bez glutena“ (World Health Organization, 2015). Prema literaturnim podacima, gluten se osim u prehrambenoj industriji primenjuje i u proizvodnji biorazgradive plastike, filmova, premaza, kozmetike i slično. Biorazgradivi filmovi napravljeni od glutena se mogu primeniti za produžavanje roka trajanja određenih prehrambenih proizvoda i za očuvanje njihove svežine. Osim toga primenu su našli i u farmaceutskoj industriji. Filmovi koji su sadržali glutenin su se pokazali kao odličan supstrat za rast osteoblasta i daljim istraživanjima je moguće obezbediti njihovu primenu u inženjerstvu tkiva (Reddy, Jiang, & Yang, 2011). Takođe je interesantno da su naučnici glutenu našli primenu i u nanotehnologijama. Naime, hidrolizati glutena korišćeni su kao gradivni blok u filmovima i u kombinaciji sa polivinil pirolidonom, polietilen glikolom i polivinil alkoholom, uz dodatak jona srebra. Ovako napravljenim filmovima su ispitane antioksidativne i antimikrobne aktivnosti, i pokazano je da se hidrolizati glutena mogu koristiti u proizvodnji sredstava za površinsko lečenje rana uz kontrolisano otpuštanje Ag⁺ i inhibiciju bakterijskog rasta (Sajjad, et al., 2023).

4. Imuni odgovor, celijačna i ostale bolesti izazvane unosom glutena

4.1. Mehanizam nastanka imunog odgovora i toksični peptidi glutena

Celijačna bolest kod čoveka predstavlja intoleranciju određene individue na unos proteina glutena. Prvi kontakt odojčeta i proteina glutena se dešava negde oko šestog meseca života (Koning, Schuppan, Cerf-Bensussan, & Sollid, 2005). Ovo oboljenje se javlja kod oko 0,7–1,4% svetske populacije, u zavisnosti od načina testiranja, i taj broj je u porastu poslednjih godina (Singh, et al., 2018). Svi koji pate od celijačne bolesti poseduju određene HLA¹-DQ molekule (*HLA-DQ2* i *HLA-DQ8*), i oni se javljaju kod 95% obolelih. S obzirom da je gluten bogat ostacima prolina (skraćeniće Pro ili P), to ga čini veoma otpornim na dejstvo proteolitičkih enzima. Usled unosa proteina glutena dolazi do upalnog procesa u tankom crevu i posledično do oštećenja samog tankog creva. Oštećenja se manifestuju u vidu propadanja crevnih resica, tačnije u „smanjivanju“ njihove visine (Catassi & Fasano, 2008).

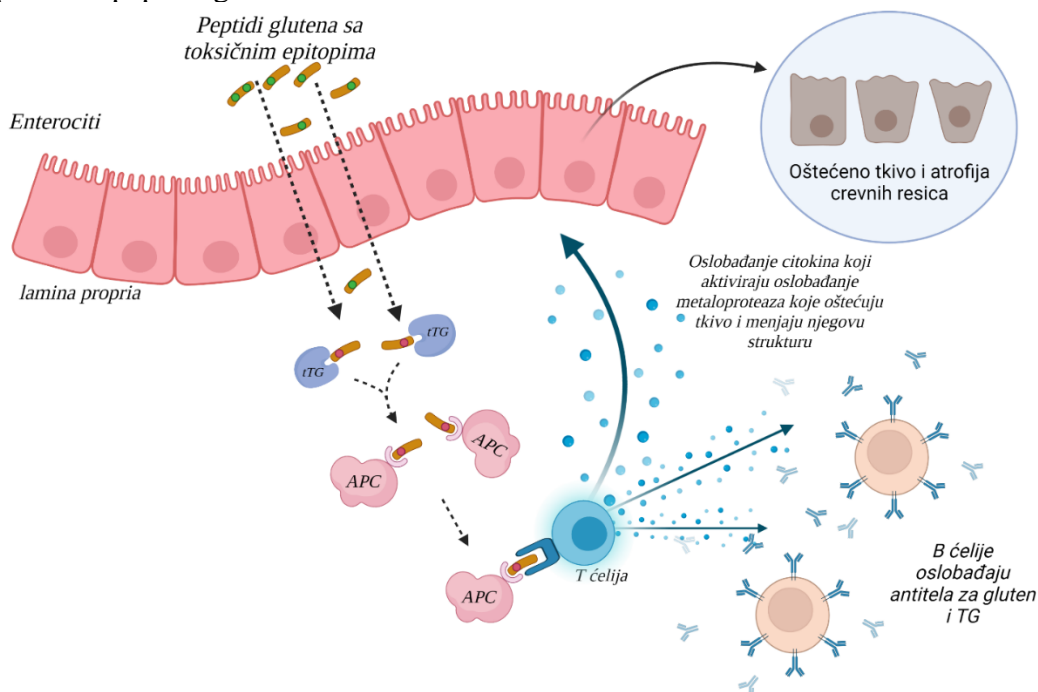
Kao što je već objašnjeno u odeljku 3.1.2, gluten se sastoji iz gliadina i glutenina. U slučaju imunog odgovora kod osetljivih pojedinaca glavnu ulogu imaju gliadini. Osim velikog sadržaja prolina koji peptid čini otpornim na digestiju, veliki sadržaj glutamina (skraćeniće: Gln ili Q) takođe igra bitnu ulogu u izazivanju imunog odgovora. Tkivna transglutaminaza (tTG) ima ulogu u deamidaciji glutaminske kiseline čime se zapravo povećava imunogenost peptida. Ovako deamidovani peptid se vezuje za HLA-DQ2/8 receptore na antigen prezentujućim ćelijama (APC) preko kojih dolazi do aktivacije T ćelija. T ćelije proizvode upalne citokine koji ukoliko deluju konstantno na tkivo tankog creva izazivaju oštećenja u vidu atrofije i hiperplazije kripti (Stoven, Murray, & Marietta, 2012). Kao posledice ovog zaravnanja crevnih resica dolazi do pojave različitih stanja organizma, kao što su hronična dijareja, umor, usporen rast i slično. Osim što se manifestuje unutar organizma, celijačna bolest se takođe ispoljava i sa spoljne strane ljudskog organizma, prvenstveno na koži. Dijagnoza ovog stanja se najčešće obavlja serološki i biopsijom (Tovoli, et al., 2015).

Limfociti su ćelije imunog sistema čoveka koje su odgovorne za prepoznavanje antigena i odgovor na njihovo prisustvo. T limfociti koji su uključeni u imuni odgovor na svojoj površini sadrže veliki broj receptora pomoću kojih se vrši prepoznavanje stranog tela. Osim što poseduju receptore, T-ćelije se mogu javiti i u obliku pomoćnih T-ćelija, i njihova funkcija je da luče protein CD4. Protein CD8 luče T citotoksične i supresorske ćelije. Prema definiciji, antigen predstavlja bilo koji molekul ili strano telo sposobno da izazove imuni odgovor. Receptori T ćelija se specifično vezuju za određene strukture u okviru antigena, i te strukture se nazivaju epitopima (Nelson & Cox, 2005; Mojović, 2008). Da bi se zaštitio od autodestrukcije, u organizmu postoje proteini koji pomažu u zaštiti ćelija i određivanju proteina poreklom iz organizma. Glavna funkcija proteinskog kompleksa pod nazivom glavni histokompatibilni kompleks (na engl. *major histocompatibility complex*, *MHC*) jeste u vezivanju peptida na svojoj površini. Nakon što MHC kompleks veže strani peptid, u ovom slučaju antigen, imuni sistem prepoznaje „uljeza“ i započinje proces imunog odgovora. U slučaju imunog odgovora na unos proteina glutena u organizam, glavni posrednik je klasa II MHC kompleksa (Wieser & Koehler, 2008; Nelson & Cox, 2005).

Da bi došlo do reakcije sa T ćelijama, uneti proteini glutena moraju nepromenjeni doći do tankog creva, a to podrazumeva da su peptidi otporni na proteaze unutar ljudskog gastrointestinalnog trakta (Arentz-Hansen, et al., 2002; Kim, Quarsten, Bergseng, Khosla, & Sollid, 2004). Reakcije deamidacije i transamidacije pomoću enzima tTG koji specifično deluje na ostatke glutamina na proteinskim frakcijama glutena dovode do nastanka glutaminske kiseline čime se povećava afinitet HLA molekula prema ovim peptidima glutena (Arentz-Hansen, et al., 2000; Quarsten, Molberg, Fugger, McAdam, & Sollid, 1999). Dorum (Dørum) i saradnici su u istraživanju odgovora T ćelija prema deamidovanim peptidima glutena došli do zaključka da je reaktivnost T ćelija povezana sa aktivnošću TG2 enzima, tačnije T ćelije su ispoljavale veći stepen prepoznavanja alergenihi epitopa

¹ HLA – Human Leukocyte Antigen

peptida glutena ukoliko su isti prethodno deamidovani u većoj meri. Takođe u zavisnosti od nivoa izvršene deamidacije peptida, HLA-DQ2 i -DQ8 molekuli različito prepoznaju ove epitope, pri čemu je izražen afinitet prema negativno naelektrisanim ostacima (Dørum, Qiao, Sollid, & Fleckenstein, 2009; Tollefsen, et al., 2006). T ćelije utiču na oslobađanje upalnih citokina (IFN- γ), čime se aktiviraju B ćelije koje proizvode antitela specifična za gluten i TG2. Delovanjem antigena na receptore B ćelija dolazi do stimulacije B ćelija i započinje njihovo umnožavanje i produkcija antitela. Prisustvo antitela je indikator za celijačnu bolest i ona nestaju u roku od nekoliko meseci nakon isključivanja glutena iz ishrane, a tokom tog perioda dolazi i do postepenog oporavka crevnih resica. Testiranja se obavljaju najčešće serološki i prvi proizvedeni testovi su bili bazirani na anti-gliadin antitelima (Cornell, 1974; Sugai, et al., 2006; du Pré & Sollid, 2015; Nilsen, et al., 1995). Kao jedna od mogućnosti za sprečavanje nastanka celijačne bolesti navodi se inhibicija enzima transglutaminaze 2 (TG2) čime bi se smanjio broj deamidovanih peptida koji bi bili prepoznatis od strane HLA molekula. Dosadašnji eksperimenti sa prototipom ovakvih inhibitora su pokazali određene ohrabrujuće rezultate, međutim usled važnosti funkcije transglutaminaza u organizmu čoveka potrebno je sprovesti još dodatnih opsežnih istraživanja kako bi se proizveli specifični selektivni TG2 inhibitori (Plugis & Khosla, 2015). Na Slici 4.1.1 ilustrovan je mehanizam nastanka imunog odgovora prilikom prolaska peptida glutena kroz tanko crevo.



Slika 4.1.1 Mehanizam nastanka imunog odgovora u tankom crevu usled prolaska peptida glutena (Ribeiro, et al., 2018; Briani, Samaroo, & Alaedini, 2008; Stoven, Murray, & Marietta, 2012) (slika kreirana u programu BioRender; „Created with BioRender.com”).

Sapone i saradnici (Sapone, et al., 2012) su dali pregled bolesti/poremećaja povezanih sa unosom glutena. Prema njihovoj klasifikaciji osetljivosti, podela izgleda ovako:

- 1) Autoimunogenost:
 - a) Celijakija
 - b) Dermatitis herpetiformis
 - c) Glutenska ataksija
- 2) Alergije:
 - a) Alergija na hranu
 - b) WDEIA
 - c) Respiratorne alergije
 - d) Koprivnjača

- 3) Neautoimuna:
a) Ne-celijakijiska osetljivost na gluten (NCGS).

Tabela 4.1. Osnovne karakteristike pšenično-zavisnih poremećaja [izvor i prilagođeno (Scherf, Koehler, & Wieser, 2016)].

Karakteristike	Celijakija	Alergija na pšenicu	NCGS
Učestalost	≈1%	≈1%	0,6–6%
Simptomi	crevni/spoljni		
Početak pojave simptoma	dani-nedelje	minuti-sati	sati-dani
Komplikacije	dugoročne	kratkoročne	dugoročne
Komorbidnosti	da	ne	ne
Genetika	HLA-DQ2/8	ne HLA-DQ2/8	ne HLA-DQ2/8
Imunitet	adaptivni/urođeni	alergijski	urođeni
Serološka analiza	IgA/IgG	IgE	IgG
Autoantitela (anti-TG2)	da	ne	ne
Histologija	II-IV	0	0-I
Protein okidač	gluten	gluten/bezglutenski	gluten/bezglutenski
Terapija	izbegavanje unosa glutena	izbegavanje konzumiranja pšenice	izbegavanje/smanjenje konzumiranja glutena/pšenice

Toksični peptidi koji izazivaju celijakiju sadrže epitope PSQQ, QQQP, QQPY i/ili QPYP i direktno stimuliraju urođeni imuni odgovor (Cornell & Wills-Johnson, 2001). Matsuo i saradnici su upotrebom 7 sintetičkih epitopa glutena koji se nalaze u okviru ω -5 gliadina ispitivali imunodominantnost. Testiranjem seruma 15 pacijenata došli su do zaključka da su epitopi QQIPQQQ, QQFPQQQ, QQSPEQQ, i QQSPQQQ imunodominantni u slučaju anafilakse izazvane vežbanjem a indukovanom konzumacijom proizvoda sa glutenom (Matsuo, et al., 2004). U **Tabeli 4.1** su date osnovne karakteristike pšenično-zavisnih poremećaja, dok su u **Tabeli 4.2** navedeni imunogeni peptidi gliadina, njihova sekvenca i pozicija. U radu novijeg datuma naučnika Solida (Sollid) i saradnika data je dopunjena lista epitopa glutena koje prepoznaju CD4⁺ T ćelije (Sollid, et al., 2020).

Pregledom baze imunogenih epitopa (Immune Epitope Database and Analysis Resource, 2022), sa celijačnom bolešću je povezano oko 1150 poznatih imunogenih epitopa. Među ovim epitopima se nalaze peptidne sekvence poreklom iz *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereale* i mnogih drugih izvora. U ovom trenutku, među trenutno poznatim epitopima, nalazi se 221 koji u sebi sadrži epitop QQPFP, 14 sa PSQQ, 69 sa QQQP, 70 sa QQPY. 1046 peptida u sebi sadrži glutamin, dok je prolin prisutan kod 1040. U ovoj bazi se mogu naći podaci o poznatim antigenima i testovima.

Tabela 4.2. Imunogeni peptidi gliadina (izvor i prilagođeno (Ciccocioppo, Di Sabatino, & Corazza, 2005)).

Skevence aminokiselina	Pozicija	Imunogenost
VRVPVPLQLPQNPSQQQPQ	α -gliadin: 1–19	+
QNPSQQQPQEQVPLVQQQ	α -gliadin: 11–28	+
QVPLVQQQQFPGQQQPFPPQ	α -gliadin: 21–40	+
PGQQQPFPPQQPYQPQPF	α -gliadin: 31–49	+
FPGQQQPFPPQQPYQPQPF	α -gliadin: 30–49	+
QPYPQPQPFPSQQPYLQL	α -gliadin: 41–58	+
PQPFPSQQPYLQLQPFQ	α -gliadin: 46–63	+
PQPQLPYQPQLPY	α -gliadin: 62–75/(a)	+ /+++
QLQPFQPYQPQLPY	α -gliadin: 57–68/(a)	+ /+++
QLQPFQ	α -gliadin: 57–63/(a)	+++

Nastavak tabele 4.2.

LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQP*	α -gliadin: 57–89/(a)	+ /+++
QLQPFQPQLPY	α -gliadin: 58–69/(a)	+ /+++
PQPQLPYPQPQLPY	α -gliadin: 63–76/(a)	+ /+++
PFRPQQPYPQPQPQ	α -gliadin: 93–106/(a)	+
LIFCMDVVLO	α -gliadin: 123–132	+
QQPLQQYPLGQGSFRPSQQNPQAQG	α -gliadin: 198–222	+
QYPLGQGSFRPSQQNPQA	α -gliadin: 203–220/(a)	+ /+
PSGQGSFQPS	α -gliadin: 205–214	-
PSGQGSFQPSQQ	α -gliadin: 205–216/(a)	+ /+++
SGQGSFQPSQQN	α -gliadin: 206–217/(a)	+ /+++
QGSFQPSQQN	α -gliadin: 208–217/(a)	- /+++
LQPQQPFPQQPQQPYPQQPQ	γ -gliadin: 60–79	+
FPQQPQQPYPQQPQ	γ -gliadin: 66–78	+
FSQPQQQFPQPQ	γ -gliadin: 102–113/(a)	- /+
OQPQQSFPEQQ	γ -gliadin: 134–153/(a)	+ /+++
VQGQGHQPQPAQL	γ -gliadin: 222–236/(a)	+ /+
QQQPPFSQQQSPFSQQQQ	glutenin: 40–59/(a)	- /+
QQPPFSQQQQLPQ	glutenin: 46–60/(a)	- /+
SGQGQRPGWLPQGGQGGYYPTSPQQSGQGQQLGQ	glutenin: 707–742/(a)	+ /+
PGQGQGGYYPTSPQQSGQ	glutenin: 719–736	+
GYYPTSPQQSGQGQQLGQ	glutenin: 725–742	+
GYYPTSPQQSG	glutenin: 725–735	+
QGGYYPTSPQQS	glutenin: 724–734/(a)	+ -
QQGGYYPTSPQQSG	glutenin: 723–735	+
GQQGGYYPTSPQQSG	glutenin: 722–735	+
GQQGGYYPTSPQQS	glutenin: 722–734	+

4.2. ELISA imunotestovi

Enzimski imunotestovi koriste enzime kao markere čime se obezbeđuje direktna kvantifikacija antigena. Imunotestovi su se pojavili oko 1970. godine, a ELISA (na engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) je jedan od najčešće korišćenih testova. ELISA imunotest je dijagnostički test i brza metoda kojom se detektuje prisustvo antigena u uzorku. Ovi testovi su jeftiniji od nekih drugih analitičkih tehnika, a enzim kao što je peroksidaza iz rena je jedan od najčešće korišćenih. Test se uglavnom izvodi u mikrotitarskim pločama (osim testova u formi brisa/štapića/tračica), pri čemu se antitela koriste za detekciju antigena od interesa.

Opšti postupak izvođenja nekompetitivnog ELISA testa zasnovan je na sledećem: u bunarčić u kome su specifična antitela adsorbovana na inertoj površini (unutar mikrotitarske ploče) se dodaje uzorak (koji u sebi sadrži antigen); određeni vremenski period se antigeni vezuju za antitela i nakon perioda inkubacije bunarčić se ispira; potom se dodaje enzimom-obeleženo antitelo (antitelo-enzim konjugat) u višku; određeni deo antitela se vezuje za imobilisani antigen, koji je ostao slobodan, dok se višak uklanja ispiranjem; dodavanjem supstrata započinje enzimski reakcija konverzije supstrata u proizvod, koji se potom kvantifikuje jednostavnim merenjem promene apsorbance na određenoj talasnoj dužini. Treba napomenuti da ukoliko se u testovima koriste monoklonska antitela (u koraku dodavanja antitelo-enzim konjugata), ona moraju prepoznati epitop na antigenu koji se razlikuje od onog koji je prepoznalo prvo antitelo (Ratledge & Kristiansen, 2001; Walsh, 2002). U detekciji alergeni epitopa glutena primenjuju se dva tipa ELISA testa: sendvič i kompetitivni test.

- **Sendvič ELISA** – princip testa je baziran na formiranju kompleksa između antitela i antigena. Nakon toga sledi dodatak antitelo-enzim konjugata, dodatkom supstrata dolazi do formiranja proizvoda, tj. do bojene reakcije. Ovi testovi se primenjuju u slučaju velikih antigena, jer je neophodno da postoje dva epitopa za koja će se vezati antitelo i antitelo-enzim konjugat.
- **Kompetitivna ELISA** – princip testa je zasnovan na jednostavnoj kompeticiji između antigena i enzim-antigen konjugata za vezivno mesto na antitelu. Ovakav tip testa se

primenjuje pri analizi malih antigena koji sadrže samo jedan epitop. Reakcijom između enzima i supstrata nastaje obojeni proizvod. Slabiji intenzitet obojenja je indikator za veću količinu vezanog antigena iz testiranog uzorka (Walsh, 2002). Razlika postoji između monoklonskih i poliklonskih antitela. Monoklonska antitela nastaju od samo jednog tipa B ćelija i prepoznaju isti epitop. Poliklonska antitela nastaju kao proizvod reakcije više različitih B limfocita prema jednom antigenu, antitela koja nastaju vezuju različite epitope. Monoklonska antitela se koriste u cilju direktnog određivanja količine prisutnog antigena u kompleksnim smešama (Nelson & Cox, 2005).

Za detekciju glutena neophodno je koristiti verifikovane analitičke metode, sa limitom detekcije od 10 mg/kg ili manjim. U **Tabeli 4.3** dat je pregled nekih od trenutno dostupnih ELISA testova. Ovi testovi moraju biti bazirani na proteinskim frakcijama koje izazivaju celijačnu bolest i koje ne reaguju sa drugim sastojcima. Trenutno stanje na tržištu ukazuje na to da je metoda bazirana na R5 monoklonskom antitelu (mAb) primarna metoda za određivanje sadržaja glutena. Primena sendvič ELISA testa se preporučuje za analizu sirovog glutena jer test zahteva prisustvo dva epitopa. Kompetitivni ELISA testovi se preporučuju za procesuiranu hranu, hidrolizovani gluten i proizvode koji sadrže gluten, jer test zahteva prisustvo manjih fragmenata sa jednim epitopom. Nedostaci ovih testova se ogledaju u tome što ni jedna metoda ne daje univerzalno rešenje i jedinstven rezultat. Glavni problem se ogleda u metodama ekstrakcije koje se razlikuju od testa do testa, pri čemu treba naglasiti da različito tretirani uzorci zahtevaju različite metode ekstrakcije. U tom pogledu, nekad je neophodno možda primeniti više različitih analitičkih testova i ekstrakcija kako bi se sa sigurnošću moglo tvrditi da je primenjeni tretman učinkovit, a određeni proizvod bezbedan za konzumiranje za osobe koje su intolerantne na gluten u bilo kom obliku. Na ovaj način se poskupljuju metode proizvodnje i analize.

Sa konstantnim razvojem tehnologije dolazi i očekivani napredak u polju imunotestova. Pregledom dostupne literature može se zaključiti da je tokom prethodnih 20 godina postignut značajan pomak u polju razvoja tačnih i pouzdanih imunotestova. Na tržištu su trenutno dostupni imunotestovi bazirani na različitim antitelima. Ta antitela mogu biti monoklonska ili poliklonska. Od monoklonskih antitela najzastupljenija su R5 mAb, Skerit mAb (401,21 mAb), G12, α 20 mAb. Svako od tih antitela je specifično prema određenom alergenom epitopu glutena. R5 mAb antitelo prepoznaje QQPFP epitop (QQQFP, LQPFP,QLPFP), G12 mAb – QPQLPY, Skerit (401,21) mAb – PQQPFPQE ili PQQPPFPEE, α 20 mAb – RPQQPYP. Testovi bazirani na poliklonskim antitelima nisu navedeni u **Tabeli 4.3**. Primena poliklonskih antitela se pokazala kao pouzdana metoda jer ne dolazi do unakrsne reakcije između antitela i proteinskih frakcija glutena iz različitih izvora. Poliklonska antitela ne podležu uticajima kao što su varijacija unutar vrste žitarica ili modifikacije tokom obrade. Nedostatak kod primene ove vrste dijagnostičkih testova jeste u ograničenoj dostupnosti poliklonskih antitela (Melini & Melini, 2018; Sharma, Rallabhandi, Williams, & Pahlavan, 2016).

Tabela 4.3. Komercijalno dostupni ELISA testovi za detekciju glutena.

Test	Vrsta testa	Limit detekcije	Antitelo	Proizvođač	Sertifikati
AgraStrip® Gluten G12®	LFD*	5-20 ppm	G12	Romer Labs	AOAC-RI 061403
AgraQuant® Gluten G12®	Sendvič	2 ppm			AOAC OMA 2014.03 AACCI 38- 52.01
GlutenTox® Pro	LFD	5 ppm		Hygiena	AOAC 061502
ALLER-TEK™ Gluten ELISA	Sendvič	5 ppm	Skerrit (mAb 401,21)	ELISA Tech	AOAC 081202
EZ Gluten TM	LFD	10 ppm			AOAC 051101
Veratox® for Gliadin R5	Sendvič	2.5 ppm	mAb (R5)	Neogen	AOAC-RI 061201
RIDASCREEN® Gliadin	Sendvič	0.5 ppm		AOAC OMA 2012.01	
RIDASCREEN® Gliadin Competitive	Kompetitivni	5 ppm		R-Biopharm	AOAC OMA 2015.05 AACCI 38-55.01 ASBCI Beer-49
Rida® Quick Gliadin	LFD	limit detekcije zavisi od upotrebe testa			AOAC-RI - PTM 101702 AOAC OMA 2015.16 AACCI 38-60.01

*LFD – *Lateral Flow Device*

5. Pretretmani glutena i njihove glavne karakteristike

Proteinske frakcije glutena i sve njegove subjedinice predstavljaju biljni izvor proteina. Ovi proteini su od ključne važnosti u mnogim prehrambenim formulacijama i neprehrambenim proizvodima. Proteini glutena se mogu koristiti za proizvodnju različitih gelova, filmova, emulzija i penastih proizvoda usled širokog spektra funkcionalnosti njegovih subjedinica da formiraju mreže sa drugim sastojcima (Zhang, et al., 2022; Mahsa & Elahe, 2014). Primenom različitih procesa kojima se ciljano menja funkcionalnost tih proteina mogu se dobiti unapređeni peptidi sa poboljšanim svojstvima čime se dodatno usavršavaju finalni proizvodi u kojima se primenjuju.

Standardni procesi koji se primenjuju za modifikaciju proteina podrazumevaju enzimske procese, genetsku manipulaciju, hemijske i fizičke postupke. Svi ovi procesi u velikoj meri utiču na fizičko-hemijska i funkcionalna svojstva proteina (Mirmoghtadaie, Aliabadi, & Hosseini, 2016). Brojne su strategije predlagane do sada za smanjenje alergnosti glutena ili njeno uklanjanje iz pšeničnog brašna. Neki od pristupa uključuju proteolitičku razgradnju epitopa glutena ili hemijsku modifikaciju odabranih ostataka transglutaminazom, procesom transamidacije (Gianfrani, et al., 2007).

Osim enzimske modifikacije, primena hemijskih procesa u cilju modifikacije proteina u nekim slučajevima može delovati štetno na ljudsko zdravlje. Fizički tretmani sa aspekta bezbednosti predstavljaju najbolju alternativu. Fizičkim tretmanima se smatraju zagrevanje, zamrzavanje, ultrazvučni talasi niske frekvencije, visok pritisak, gama i mikrotalasno zračenje. Od navedenih fizičkih tretmana, do sada je ispitivan uticaj mikrotalasnog tretmana, impulsnog svetla i ultrazvuka na smanjenje imunoreaktivnosti proteina glutena (Leszczynska, Łacka, Szemraj, Lukamowicz, & Zegota, 2003; Lamacchia, Landriscina, & D'Agnello, 2016; Panozzo, Manzocco, Lippe, & Nicoli, 2016).

5.1. Mikrotalasno zračenje

Mikrotalasne pećnice su od početka 1980. pa do danas postale standardni uređaji koji se nalaze gotovo u svakoj kuhinji. Ovi uređaji obezbeđuju kraće vreme pripreme obroka i smanjuju utrošak energije. Osim u pripremi hrane ovi uređaji su tokom godina našli i primene u različitim tehnološkim postupcima (Jiang, Liu, & Wang, 2018; Li, et al., 2021; Ekezie, Sun, & Cheng, 2017; Ilić, et al., 2022; Bezbradica, Mijin, Mihailović, & Knežević-Jugović, 2009). Običan postupak zagrevanja materijala se obavlja konvekcijom i/ili kondukcijom preko površine materijala. Mikrotalasna energija se prenosi direktno u materijal koji se tretira, posredstvom molekularnih interakcija sa elektromagnetnim poljem. Dakle, mikrotalasno zagrevanje predstavlja transformaciju elektromagnetne energije u toplotnu energiju (Thostenson & Chou, 1999).

Zagrevanje usled delovanja mikrotalasa zasnovano je na transformaciji energije naizmeničnog elektromagnetnog polja u toplotnu energiju delovanjem na polarne molekule materijala (Yadav, Anand, Kaur, & Singh, 2012). Tretman mikrotalasa se smatra prikladnijim za upotrebu usled niskih operativnih troškova i preciznije kontrole tokom zagrevanja, u poređenju sa drugim toplotnim tretmanima (Ren & Cheng, 1998). To predstavlja kontinualan proces koji omogućava da se velike količine proizvoda obrade u kraćim vremenskim periodima pri čemu ne zaostaju nikakve hemijske supstance u hrani, i samim tim izbegava se štetan uticaj na ljudsko zdravlje (Yadav, Anand, Kaur, & Singh, 2012).

Mikrotalas je elektromagnetni talas frekvencije od 300 MHz-300 GHz (što odgovara talasnim dužinama između 1 cm i 1 m) koji može da izazove vibracije na molekularnom nivou (Banik, Bandyopadhyay, & Ganguly, 2003). U elektromagnetnom spektru oblast mikrotalasnog zračenja se nalazi između infracrvenog zračenja i radiotalasa. Većinu frekvencija pokrivaju telekomunikacioni i radarski uređaji, pri čemu se za rad u laboratoriji koriste mikrotalasni uređaji od 2,45 GHz. Mikrotalasi mogu da izazovu promene u polarnosti vode delovanjem spoljnog električnog polja visoke frekvencije, što dalje izaziva molekularno pomeranje i uzajamno trenje. Stoga, mikrotalasi se konvertuju u toplotu i povećavaju temperaturu materijala koji se tretira (Banik, Bandyopadhyay, &

Ganguly, 2003; Thostenson & Chou, 1999; Mijin & Petrović, 2005). Postoje podaci da mikrotalasi mogu da promene strukturu materijala i trajno promene svojstva istog (Liu & Ma, 2016). Mikrotalasna toplotna energija smatra se pogodnim sredstvom koje obezbeđuje ravnomerno zagrevanje kroz uzorak, u poređenju sa direktnim zagrevanjem u rerni, i stoga se može koristiti za postupke gde je neophodno uniformno umrežavanje unutar uzorka (Larhed & Hallberg, 2001).

U nekim od najranijih eksperimenata naučnici su se bavili mikrotalasnim tretmanima pšeničnog brašna pri visokim i niskim snagama mikrotalasa, pri čemu su naknadno ispitivana biohemijska, fizička i viskozna svojstva (MacArthur & D'Appolonia, 1981). Mikrotalasi su primenjivani i u eksperimentima koji su za cilj imali sušenje pšeničnih zrna. Rezultati tih eksperimenata su pokazali da sadržaj proteina nije promenjen zagrevanjem do temperature od 91 °C, dok je gluten ostao neoštećen sve dok temperatura nije prešla preko 66 °C (Campaña, Sempé, & Filgueira, 1986). Tokom prerade hrane vrši se važan uticaj na konformaciju proteina, zamotavanje i odmotavanje polipeptidnih lanaca koji menjaju ponašanje proteina u određenom sistemu. Uticaj mikrotalasnog tretmana na pšenična zrna je takođe ispitan primenom patentirane metode koja obuhvata primenu visoke temperature u kratkom vremenskom periodu, uz visok stepen vlažnosti zrna i energije mikrotalasa (Lamacchia, Landriscina, & D'Agnello, 2016), a efekti ovog tretmana ogledaju se u izmenjenoj rastvorljivosti i smanjenoj alergnosti. Dejstvo povišene temperature na zrna pšenice rezultuje u novom načinu polimerizacije proteina u poređenju sa reakcijom polimerizacije u model sistemu glutena, na osnovu čega se može zaključiti da se u jednostavnom postupku zagrevanja glutena može prepoznati postupak za proizvodnju glutena sa izmenjenim svojstvima (Lamacchia, Baiano, Lamparelli, Notte, & Luccia, 2010). U skladu sa prethodno navedenim podatkom da do promene u strukturi glutena ne dolazi sve dok temperatura kojom se deluje ne pređe preko 66 °C, produženo trajanje tretmana (≥ 30 s) dovodi do daljeg porasta temperature pri čemu gluten trpi određena oštećenja i postaje nepodesan za proizvodnju pekarskih proizvoda u vidu hleba, ali prednost se ogleda u tome da tretman rezultuje smanjenim sadržajem glutena. Prilikom mikrotalasnog zagrevanja pšeničnih zrna do temperatura ispod 56 °C, uočene su manje promene u viskoznim i farinografskim merenjima (Qu, Wang, Liu, Wang, & Liu, 2017). Izlaganjem pšeničnih zrna mikrotalasima antigenost se može potencijalno u potpunosti ukloniti. S obzirom da se proteini pšeničnog zrna greju pod dejstvom mikrotalasa dok se nalaze u samom endospermu, do promena (konformacije i strukture) može doći u različitim proteinskim frakcijama još pre nego što je gluten formiran (Lamacchia, Landriscina, & D'Agnello, 2016). Ova istraživačka grupa je prva uspela da objasni vezu između mehanizma delovanja mikrotalasnog tretmana na gluten i reaktivnosti komercijalno dostupnog R5-monoklonskog antitela sa modifikovanim epitopima glutena.

Primena fizičkog tretmana u vidu mikrotalasa rezultuje u promenama strukture, funkcionalnih svojstava i nutritivnih vrednosti prehrambenih proizvoda. Istraživanja su do sada bila bazirana uglavnom na uticaj mikrotalasnog zračenja na rastvorljivost proteina nakon tretmana, funkcionalna svojstva mikrotalaso tretiranih proteina (emulgujuća svojstva, kapacitet i stabilnost pene, kapacitet vezivanja vode i drugi). Mikrotalaso tretirani proteini glutena su pokazali određene promene u odnosu na netretirane uzorke. U zavisnosti od vrste analize, mikrotalasi su davali i pozitivne i negativne rezultate u donosu na netretirane uzorke.

Kada je ispitan uticaj mikrotalasnog zračenja na rastvorljivost proteina glutena, duže vreme izlaganja rezultovalo je u smanjenoj vrednosti rastvorljivosti proteina (Yalcin, Sakiyan, Sumnu, Celik, & Koxsel, 2008). Rastvorljivost proteina ima višestruk uticaj na ponašanje proteina u hrani i njihova svojstva, pri čemu se ona povećava usled promene u veličini molekula i sekundarnoj strukturi proteina (Ashraf, Saeed, Sayeed, & Ali, 2012). Osim toga, mikrotalaso zračenje inaktivira antinutrijente kao što su Tripsin i Amilaza inhibitori, čime je poboljšana dostupnost i svarljivost proteina i skroba (Snyder & Kwon, 1987).

Povećan kapacitet vezivanja vode nakon dejstva mikrotalasa na gluten se objašnjava odmotavanjem proteina i izlaganjem više hidrofилnih grupa koje su direktno povezane sa povećanim kapacitetom vezivanja vode. Mikrotalasnim tretmanom žitarica se povećava kapacitet vezivanja vode, a samim tim se vrši direktan uticaj na teksturu i hrskavost proizvoda. Ovo poboljšano svojstvo je neophodno u postupcima proizvodnje mesnih prerađevina i pekarskih proizvoda (Ashraf, Saeed,

Sayed, & Ali, 2012). Osim na kapacitet vezivanja vode, mikrotalasni tretman utiče i na kapacitet vezivanja ulja. Povećanje u kapacitetu vezivanja ulja je direktno povezano sa povećanjem vremena izlaganja pšeničnog brašna mikrotalasima (Ashraf, Saeed, Sayeed, & Ali, 2012). Izlaganjem hidrofobnih grupa proteina dolazi do povećanja interakcije između uljane faze i proteina.

Kapacitet formiranja pene direktno zavisi od količine hidrofobnih aminokiselina izloženih na površini molekula proteina (Kong, Zhou, & Qian, 2007). Sa povećanjem vremena trajanja mikrotalasnog tretmana kapacitet formiranja pene se povećava, i samim tim se ovako tretirana brašna mogu primeniti u formulacijama za koje je neophodno formiranje pene, kao što su pekarski proizvodi i sladoled (Ashraf, Saeed, Sayeed, & Ali, 2012). Osim unapređenog svojstva formiranja pene, mikrotalasni tretman dovodi i do povećanog kapaciteta stabilnosti pene. Emulgujuća svojstva proteina glutena poreklom iz pšeničnog brašna takođe su unapređena primenom mikrotalasnog zračenja (Yalcin, Sakiyan, Sumnu, Celik, & Koksels, 2008).

Rezultati istraživanja uticaja mikrotalasa na pšenična zrna koje su sprovedli Đanfrani i saradnici su pokazali da mikrotalasi imaju uticaj na imunološki potencijal glutena. Sadržaj glutena određen je korišćenjem R5 sendvič ELISA testa i poređenjem sa netretiranim uzorcima pokazali su drastično smanjenje količine glutena, za približno 70 ppm (Gianfrani, et al., 2017).

U prethodnim godinama tehnologija hrane se bavila razvojem inovativnih proizvoda bez glutena sa ciljem unapređenja kvaliteta života osoba koji pate od celijakije. Bilo je pokušaja da se pšenično brašno transformiše u sirov materijal bez glutena, sa sadržajem glutena manjim od 20 ppm kako bi bilo saglasno sa preporukom Codex Alimentarius (FAO, CODEX STAN 118-1979 (2008), 2015).

Raniji eksperimenti su pokazali da mikrotalasno tretirana pšenica ima smanjenu reaktivnost prema R5 antitelu i da potencijalno ima blagotvoran efekat na mikrobiotu stomaka. Sam R5 ELISA test je pokazao da je sadržaj glutena drastično smanjen delovanjem mikrotalasa na pšenična zrna. Koherentno, imunotestovi bazirani na ćelijama pacijenata iz mukoznog sloja creva pacijenata obolelih od celijakije naglasili su znatno nisku imunogenost u alkoholu rastvorljive frakcije gliadina iz pšenice tretirane mikrotalasima (Gianfrani, et al., 2017). R5-ELISA imunotest je pokazao da je značajno smanjen stepen detekcije proteina glutena, ukazujući na to da mikrotalasni tretman koji je izvršen deluje tako da gliadin smanjuje svoju unakrsnu reaktivnost sa R5 monoklonskim antitelom (Lamacchia, Landriscina, & D'Agnello, 2016).

6. Modelovanje procesa i metoda odzivnih površina – Box-Behnken model

U okviru ove doktorske disertacije izvršena je optimizacija postupka enzimske hidrolize pšeničnog brašna modelovanjem procesa i primenom metodologije odzivnih površina Box-Behnken. Razvoj postupka proizvodnje proteina, izolacije bioaktivnih komponenti, modifikacije određenih sirovina u cilju proizvodnje proizvoda određenih željenih svojstava podrazumeva ispitivanje velikog broja procesnih parametara. Međutim određena svojstva zahtevaju variranje više tačno određenih procesnih parametara. Tako da bi se dobio proizvod određenih svojstava potrebno je izvršiti veliki broj nezavisnih eksperimenata. Ranije su takvi postupci optimizacije izvođeni jednostavnim metodom probe i greške, bazirani na nekom ranijem iskustvu i znanju. Međutim, za proizvodnju nekog specifičnog proizvoda u većini slučajeva je potrebno ispitati više od 2 procesna parametra. Samim tim se postupak optimizacije usložnjava i poskupljuje jer je potrebno izvesti određeni broj ponavljanja pod istim reakcionim uslovima. Izvođenjem studije optimizacije procesa se smanjuju troškovi samog eksperimentalnog rada i dobijaju pouzdani opsezi reakcionih parametara koji će se dalje ispitivati.

Reakcioni uslovi (ulazni faktori) direktno utiču na kvalitet i performanse krajnjeg proizvoda (izlazni faktori). Tako na primer, za dobijanje proteinskih hidrolizata određenih bioaktivnih svojstava potrebno je odrediti optimalne reakcione uslove kao što su pH reakcije, temperatura reakcije, enzim-supstrat odnos i slično; za ekstrakciju određenog enzimskog preparata iz fermentacione smeše dobijene fermentacijom na čvrstoj podlozi potrebno je optimizovati pH pufera za ekstrakciju, vreme trajanja ekstrakcije, uslove mešanja. Na osnovu ova dva jednostavna primera možemo zaključiti da

više faktora sa sigurnošću usložnjava sam postupak. Stoga finalni proizvod (y) i svi parametri reakcije (x) koji na njega utiču se mogu opisati funkcijom.

Prilikom ispitivanja određenih postupaka, eksperimentalni dizajn se koristi kako bi se odredili ulazni faktori (x) koji značajno utiču na krajnji proizvod (y). Takođe bitno je naglasiti da se ovim postupkom podešava vrednost ulaznog faktora (x), tako da se krajnji proizvod nalazi u željenom opsegu vrednosti sa minimalnim odstupanjima. Krajnji cilj primene eksperimentalnog dizajna je dobijanje podataka o bitnim ulaznim faktorima, tačnije uvid u to koji od ulaznih faktora značajno, srednje ili ne utiče na krajnji proizvod (Das & Dewanjee, 2018).

Jedna od najčešće korišćenih metoda optimizacije jeste „jedan po jedan parametar“ (na engl. *OVAT – one variable at a time*), gde se vrednost jednog parametra menja u različitim opsezima, dok se ostali zadržavaju na konstantnim vrednostima. Međutim, glavni nedostatak ovog pristupa je taj što je nepouzdan, neefikasan i neophodno je utrošiti mnogo vremena u eksperimentalnom radu kako bi dobili približno optimalne reakcione uslove. Takođe, ova metoda ne daje uvid u međusobnu interakciju među parametrima.

Zavisnost nekog svojstva krajnjeg proizvoda (y) od ulaznih parametara (x) se može predstaviti funkcijom:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n) + \varepsilon \quad (1)$$

gde ε predstavlja grešku koja se javlja u y .

Najjednostavnija korelacija među parametrima se može izraziti primenom linearne funkcije oblika:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \varepsilon \quad (2)$$

gde je b_0 – odsečak, b_i – regresioni koeficijenti, i – broj faktora i x_i – nezavisni faktor.

Ukoliko postoji interakcija između različitih ulaznih parametara, jednačina (2) se prevodi u sledeći oblik:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k b_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3)$$

gde su b_0 , b_i i b_{ij} regresioni koeficijenti odsečka, linearnog i modela sa interakcijom.

Kvadratni model se koristi kako bi se utvrdile nelinearne zavisnosti između ulaznih parametara i krajnjeg proizvoda, i taj model se predstavlja jednačinom (4):

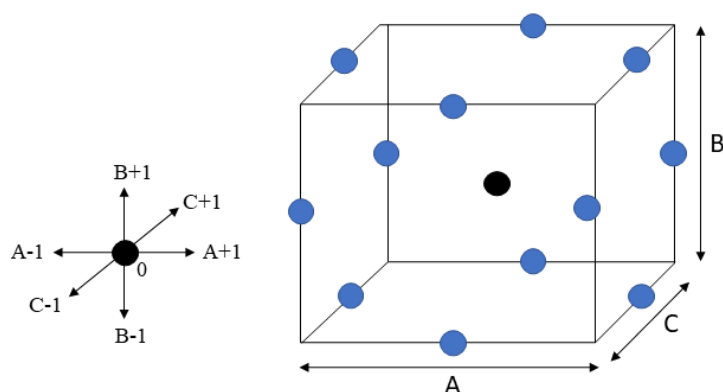
$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k b_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (4)$$

gde su b_0 , b_i , b_{ii} i b_{ij} su regresioni koeficijenti za odsečak, linearnu, kvadratnu i međusobnu interakciju, respektivno, dok su x_i i x_j nezavisne promenljive.

Neke od najčešće korišćenih metoda odzivnih površina (na engl. *RSM – response surface method*) su centralni kompozitni dizajn, Box-Behnken dizajn i Doehlertov dizajn (Ferreira, et al., 2007). Za sve metode je neophodno uneti minimalne i maksimalne vrednosti faktora koji se ispituju kako bi se ispitali na više različitih nivoa. Metode odzivnih površina se uglavnom koriste za fitovanje kvadratnih modela. U Box-Behnken i centralnom kompozitnom dizajnu ulazni faktori se ispituju na 3 ili 5 različitih nivoa.

6.1. Box-Behnken dizajn

Box-Behnken dizajn predstavlja rotirajući ili skoro rotirajući dizajn drugog reda. Ulazni faktori u ovom modelu se ispituju na 3 različita nivoa (-1,0,1) (Tabela 6.1). Ovaj model zahteva prisustvo tri ulazna faktora (ili više), ali broj nivoa je uvek ograničen na tri. Ovime se Box-Behnken model izdvaja od ostalih. Box-Behnken dizajn je preporučljivo koristiti kada se očekuje da se optimalne vrednosti faktora nalaze na sredini zadanog opsega. Ovaj model se ne koristi za ispitivanje ekstremnih vrednosti ulaznih faktora, s obzirom na to da je metoda bazirana na kombinovanju tri faktora, 2 čije se vrednosti nalaze na sredini zadanog opsega, dok se treći zadržava u centralnoj tački (Slika 3). Centralna tačka (crna tačka, Slika 6.1.1.), gde su faktori svi zadržani na srednjoj vrednosti (0,0,0), se ponavlja između 3 i 5 puta, kako bi se odredio stepen slobode i predstavlja referentnu tačku eksperimentalne postavke (De Leon, Kidd, & Corzo, 2010).



Slika 6.1.1. Box-Behnken eksperimentalni dizajn.

Tabela 6.1. Kodirani nivoi faktora za Box-Behnken dizajn (Box & Behnken, 1960).

Broj faktora (k)											
Tri faktora			Četiri faktora				Pet faktora				
X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3	X_4	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
± 1	± 1	0	± 1	± 1	0	0	± 1	± 1	0	0	0
± 1	0	± 1	0	0	± 1	± 1	0	0	± 1	± 1	0
0	± 1	± 1	0	0	0	0	0	± 1	0	0	± 1
0	0	0	± 1	0	0	± 1	± 1	0	0	0	0
			0	± 1	± 1	0	0	0	0	± 1	± 1
			0	0	0	0	0	0	0	0	0
			± 1	0	± 1	0	0	± 1	± 1	0	0
			0	± 1	0	± 1	± 1	0	0	± 1	0
			0	0	0	0	0	0	± 1	0	± 1
			± 1	0	0	0	0	0	0	0	± 1
			0	± 1	0	± 1	± 1	0	± 1	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0	0

U slučaju eksperimentalnog dizajna sačinjenog od 4 faktora i 3 nivoa potrebno je izvesti najmanje 27 eksperimenata kako bi se ispitao kvadratni model. Broj eksperimenata (n) koji je potrebno izvesti kako bi se dobio kvadratni model se izračunava preko jednačine (5):

$$n = 2 \times k \times (k - 1) + C \quad (5)$$

gde je k – broj eksperimentalnih faktora, C – broj ponavljanja u centralnoj tački.

7. Miksolab analiza

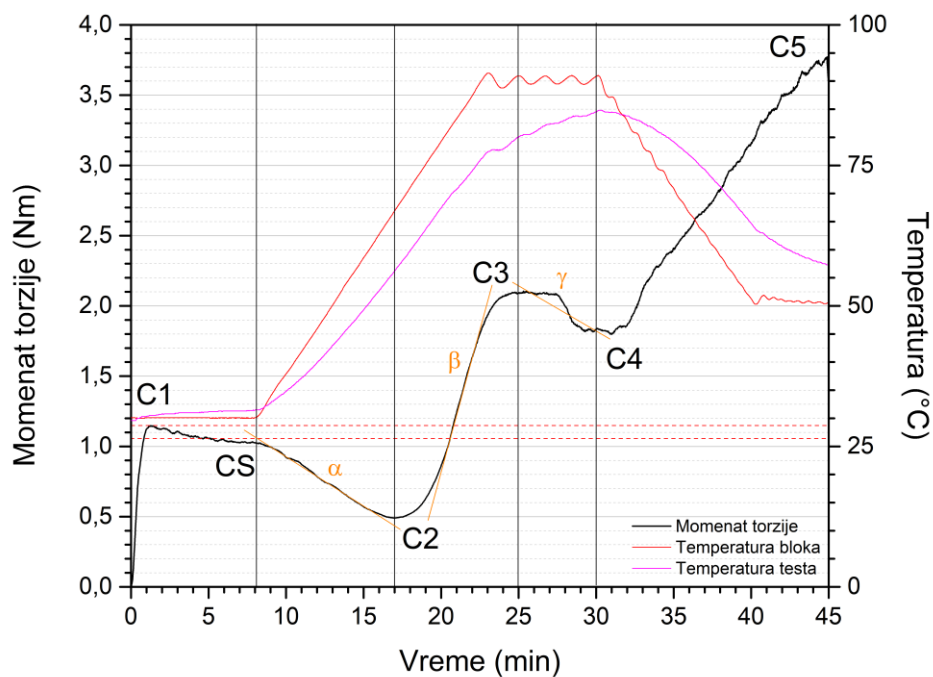
7.1. Ispitivanje reoloških osobina testa pomoću Miksolaba

Miksolab (Mixolab[®], Chopin Technology, Francuska) je uređaj koji omogućava ispitivanje reoloških osobina testa tokom procesa mešanja i simultanog zagrevanja. Analiza je bazirana na ispitivanju određene količine odabranog čistog brašna, brašna sa aditivima (so, šećer, mast, enzimi, emulgatori, hidrolizati i slično), smeše dva ili više brašna, brašna delimično supstituisanih sa hidrolizatima proteina iz različitih izvora, a sve to uz dodatak određene količine vode u cilju formiranja testa. Testovi mogu biti bazirani na eksperimentima sa konstantnom hidracijom ili ciljanom konzistencijom od $1,1 \pm 0,05$ Nm (ekvivalentna vrednost za 500 Farinografskih (Farinograph[®]) jedinica) (Dubat & Boinot, 2012). Pomoću Miksolab programa na računaru mogu se odabrati različiti protokoli pomoću kojih se dolazi do podataka o uticaju mehaničkih i termičkih faktora na odabranu zamesu testa.

Sam postupak analize sastoji se od 5 faza (C1–C5) (Slika 7.1.1.), pri čemu se u početku brašno umešava sa vodom pri konstantnoj temperaturi 30 °C, potom imamo fazu porasta i zadržavanja temperature na 90 °C, a nakon toga sledi faza hlađenja do 50 °C. Miksolab tokom 5 faza merenja u realnom vremenu daje podatke o vrednosti momenta torzije (Nm), koji nastaje prilikom mešanja testa pomoću dve lopatice u modulu. Nakon faze inicijalnog mešanja pri konstantnoj temperaturi, sledi faza razvoja testa tokom koje miksolab daje podatke o momentu torzije kao funkcija vremena i temperature (Hadnađev, Torbica, & Hadnađev, Rheological properties of wheat flour substitutes/alternative crops assessed by Mixolab., 2011). Primenom Miksolaba moguće je ispitati svojstva testa u pogledu doprinosa koji daju prisutni proteini i skrob (slabljenje proteinske mreže, geliranje skroba, retrogradacija skroba i slično). Ekstenzivna ispitivanja su pokazala da su rezultati dobijeni pomoću Miksolaba u smislu ponovljivosti izuzetno pouzdani i da se Miksolab može primenjivati za pouzdane analize brašna. U cilju tumačenja dobijenih rezultata pomoću Miksolaba, neophodno je dati objašnjenje glavnih parametara koji figurišu u analizi, a koji su takođe obeleženi na Slici 7.1.1. (Gujral, Sharma, & Khatri, 2018; Švec & Hrušková, 2015; Hadnađev, 2013):

- Step en hidracije – količina vode potreba za postizanje konzistencije testa od $1,1 \pm 0,05$ Nm;
- Vreme razvoja testa – vreme (min) neophodno da se postigne torzija C1, što je vreme duže to je brašno tvrđe;
- Stabilnost testa – otpor testa prilikom mešanja, što je vreme (min) duže brašno je tvrđe;
- Amplituda – izražava se u Nm, predstavlja elastičnost testa, što je veća vrednost elastičnost testa je veća;
- C1 – maksimalna vrednost torzije (Nm) na kraju inicijalne faze mešanja (30 °C), služi za određivanje moći upijanja vode (step en hidracije) kako bi se postigla željena vrednost konzistencije od $1,1 \pm 0,05$ Nm;
- CS – konzistencija testa nakon 8 min mešanja pri konstantnoj temperaturi od 30 °C;
- C2 – minimalna vrednost torzije (Nm) na početku faze zagrevanja, predstavlja meru slabljenja proteinske mreže u funkciji mehaničkog mešanja i temperature;
- C3 – maksimalna vrednost torzije (Nm) tokom faze zagrevanja, mera klajsterizacije (geliranja) skroba;
- C4 – minimalna vrednost torzije (Nm) nakon faze zagrevanja, mera stabilnosti nastalog vrućeg gela;
- C5 – maksimalna vrednost torzije (Nm) nakon hlađenja (50 °C), mera retrogradacije skroba tokom faze hlađenja;
- α – brzina slabljenja proteina pod uticajem toplote, Nm/min;
- β – brzina geliranja skroba (nagib krive između tačaka C2 i C3), Nm/min;
- γ – brzina degradacije enzima (nagib krive između C3 i C4), Nm/min;
- C1–C2 – jačina proteinske mreže prilikom zagrevanja testa, Nm;
- C3–C2 – intenzitet geliranja skroba, Nm;

- C3–C4 – pad viskoznosti, stabilnost vrućeg gela, Nm;
- C5–C4 – retrogradacija skroba, Nm;
- Mehaničko slabljenje proteina (MSP) – $MSP (\%) = (C1 - CS) / C1 \times 100$;
- Termomehaničko slabljenje proteina (TMSP) – $TMSP (\%) = (CS - C2) / C1 \times 100$;
- Stabilnost skrobne paste – odnos minimuma torzije nakon zagrevanja i maksimuma torzije na početku zagrevanja, C4/C3;
- Procenat retrogradacije skroba – $PRS (\%) = (C5 - C4) / C5 \times 100$;



Slika 7.1.1. Primer Mixolab® krive pšeničnog brašna analiziranog pri standardnom Chopin+ protokolu (masa testa 75g, brzina mešanja 80 rpm).

8. Eksperimentalni deo

8.1. Materijali i instrumenti

8.1.1. Materijali - Enzimi i hemikalije

Polazne proteinske sirovine bogate glutenom, a korišćene za pripremu proteinskih uzoraka sa modifikovanom alergenošću, u ovom eksperimentalnom radu, bile su:

- gluten iz pšenice ($\geq 75\%$ proteina) – Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD,
- gliadin iz pšenice (pšeničnog glutena) – Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD,
- pšenično belo brašno „tip 400 meko“ – Danubius, Novi Sad, Republika Srbija,
- heljdino integralno brašno – Vega, Republika Srbija.

U cilju enzimske hidrolize glutena poreklom iz pšenice, korišćeni su različiti komercijalno dostupni proteolitički enzimi:

- Alkalaza (*na engl.* Alcalase[®] 2.4L, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) – nespecifična serinska endopeptidaza iz soja *Bacillus licheniformis*,
- Pronaza (*na engl.* Pronase[®], Roche Diagnostics GmbH, Nemačka) – specifična egzo- i endopeptidaza izolovana iz soja *Streptomyces griseus*,
- Flevorzim (*na engl.* Favourzyme[®], Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) – specifična egzo- i endopeptidaza izolovana iz soja *Aspergillus oryzae*.

Bakterijske kulture korišćene u cilju proizvodnje proteolitičkih enzima za razgradnju proteina glutena predstavljaju deo kolekcije mikroorganizama laboratorije za mikrobiologiju na katedri za Biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, i to:

- *Bacillus subtilis* TMF-1,
- *Bacillus cereus*.

Mikrobiološka analiza sprovedena u cilju određivanja potencijalne antimikrobne aktivnosti dobijenih hidrolizata glutena izvršena je korišćenjem sojeva mikroorganizama koji takođe čine kolekciju mikroorganizama laboratorije za mikrobiologiju na katedri za Biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, i to:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 – Gram (+) bakterija,
- *Escherichia coli* ATCC 25922 – Gram (-) bakterija,
- *Candida albicans* ATCC 24433 – kvasac.

Za pripremu mikrobioloških podloga i za potrebu eksperimentalnih mikrobioloških analiza, korišćene su sledeće hemikalije i supstrati:

- gluten – MP biomedicals LLC, Ohajo, SAD,
- tripton soja agar – Institut Torlak, Beograd, Republika Srbija,
- tripton soja bujon – Institut Torlak, Beograd, Republika Srbija,
- ekstrakt kvasca – Institut Torlak, Beograd, Republika Srbija,
- pepton 1 – Institut Torlak, Beograd, Republika Srbija,
- agar – Institut Torlak, Beograd, Republika Srbija,
- glukoza – Fisher Chemicals, Velika Britanija,
- natrijum-hidrogenfosfat, Na_2HPO_4 – Centrohem, Stara Pazova, Republika Srbija,
- kalijum-dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 – Lach-Ner Ltd., Neratovice, Češka Republika,
- magnezijum-sulfat heptahidrat, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – NRK inženjering, Beograd, Republika Srbija,
- kalcijum-hlorid dihidrat, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – Lach-Ner Ltd., Neratovice, Češka Republika,
- natrijum-hlorid, NaCl – NRK inženjering, Beograd, Republika Srbija,
- etanol, 96% – Sani-Hem, Novi Bečej, Republika Srbija,
- natrijum-hidroksid, NaOH – Lach-Ner Ltd., Neratovice, Češka Republika,
- kalijum-natrijum-tartarat tetrahidrat, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – Lach-Ner Ltd., Neratovice, Češka Republika,

- albumin iz goveđeg seruma (*na engl.* BSA – bovine serum albumine) – Sigma-Aldrich, St. Louis SAD,
- Folinov reagens (*na engl.* Folin-Ciocalteu's phenol reagent) – CARLO ERBA Reagents SAS, Val de Reuil, Francuska,
- trihlorsirćetna kiselina – CARLO ERBA Reagents SAS, Val de Reuil, Francuska,
- azokazein – Sigma-Aldrich, St. Louis SAD,
- Gly-Pro-p-NA – Sigma-Aldrich, St. Louis SAD,
- sirćetna kiselina – Zorka Pharma, Šabac, Republika Srbija.

Za potrebe određivanja sadržaja ukupnih i rastvorljivih proteina hidrolizovanih/nehidrolizovanih uzoraka glutena kao i njihovu karakterizaciju određivanjem funkcionalnih svojstava, korišćene su sledeće hemikalije:

- natrijum-karbonat, Na_2CO_3 – Zorka, Šabac, Republika Srbija,
- bakar (II)-sulfat pentahidrat, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – Zorka, Šabac, Republika Srbija,
- natrijum-hidrogenfosfat, Na_2HPO_4 – Centrohema, Stara Pazova, Republika Srbija,
- natrijum-dodecil-sulfat, SDS – Lach-Ner Ltd., Neratovice, Češka Republika,
- hlorovodonična kiselina, HCl – Lach-Ner Ltd., Neratovice, Češka Republika,
- sumporna kiselina, H_2SO_4 – Zorka Pharma, Šabac, Republika Srbija,
- katalizator za digestiju uzoraka na bazi bakra, Kjeldal tablete, Kjeldahl catalyst tablets copper, sadrže 5g K_2SO_4 i ekvivalent 0,1g CuSO_4 – Fisher Chemical™, Beč, Austrija,
- suncokretovo ulje – Dijamant, Zrenjanin, Republika Srbija.

Za određivanje strukturnih karakteristika hidrolizovanih/nehidrolizovanih uzoraka glutena, korišćeni su sledeći reagensi:

- 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina), DTNB – Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD,
- glicin – Lach-Ner Ltd., Neratovice, Češka Republika,
- urea – Merck, Darmštadt, Republika Nemačka,
- metanol, HPLC grade – Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD,
- acetonitril, HPLC grade – J.T.Baker, SAD,
- trifluorsirćetna kiselina, TFA – Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD,
- 2-merkaptoetanol – Fisher Bio Reagents, Republika Kina,
- etilendiamintetra-acetat, EDTA – Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD,

U cilju ispitivanja antioksidativnih svojstava proizvedenih hidrolizata proteina korišćeni su sledeći reagensi:

- 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)-diamonijumova so, ABTS – Alfa Aesar, Masačusets, SAD,
 - gvožđe (II)-hlorid, FeCl_2 – Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD,
 - natrijumova so 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-4',4''-disulfonske kiseline, Ferozin (*na engl.* Ferrozine) – Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD,
 - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, DPPH – Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD,
 - kalijum-persulfat, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ – Lach-Ner Ltd., Neratovice, Češka Republika,
 - 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol, TRIS – Merck, Darmštadt, Republika Nemačka,
- Za potrebe elektroforetskih analiza korišćene su sledeće hemikalije:
- Coomassie Brilliant Blue R-250 – Fisher BioReagents, Velika Britanija,
 - standardni proteinski markeri za elektroforezu opsega 10 do 260 kDa, Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder – Thermo Scientific™, SAD,
 - 12% poliakrilamidni gelovi za razdvajanje (Precise™ Protein Gels, 10 cm × 8 cm, 12-wells) – Thermo Scientific, Rokford, SAD,
 - ditiotreitrol, DTT – Fisher Chemicals, Velika Britanija,
 - glicerol – NRK inženjering, Beograd, Republika Srbija,
 - bromfenol plavo – Acros Organics, SAD,

- komercijalni pufer za razdvajanje uzoraka, Tris-HEPES-SDS pufer – Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD,
Za potrebe određivanja alergene gluteina, korišćeni su sledeći kitovi i hemikalije:
- kompetitivni ELISA test, RIDASCREEN® Gliadin competitive – R-Biopharm AG, Darmstadt, Republika Nemačka,
- etanol, 60% (v/v) – Sani-Hem, Novi Bečej, Republika Srbija.

8.1.2. Korišćeni instrumenti

Uređaji i oprema koja su korišćeni za realizaciju istraživanja u ovom radu bili su:

- UV-Vis spektrofotometar Ultrospec™ 3300 – Amersham Biosciences, Velika Britanija,
- UV spektrofotometar UV-1800 – Shimadzu Corp., SAD
- Anton Paar Monowave 300 mono-modni mikrotalasni reaktor – Anton Paar GmbH, Grac, Austrija,
- analitička vaga Mettler AJ100 – Mettler, Švajcarska,
- Zetasizer Nano ZS – Malvern Instruments Ltd., Vusteršir, Velika Britanija,
- vodeno kupatilo Waterbath MS3 – Memmert, Republika Nemačka,
- magnetna mešalica Heidolph MR 3001 – Heidolph instruments, Švabuh, Republika Nemačka,
- magnetna mešalica sa automatskom regulacijom temperature – IKA® C-MAG HS 7 sa ETS-D6, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Štaufen, Republika Nemačka,
- mikrocentrifuga sa hlađenjem, Fresco™ 21 Microcentrifuge – Thermo Fisher Scientific, SAD,
- pH metar, Eutech™ pH 5+ pH meter – Thermo Fisher Scientific, grad, SAD,
- propelerska mešalica Heidolph RZR 2020 – Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Švabuh, Republika Nemačka,
- liofilizator CHRIST Beta 2-8 LDPlus – CHRIST, Osterode am Harz, Republika Nemačka,
- sistem za tečnu hromatografiju pod visokim pritiskom, HPLC sistem: Shimadzu® uređaj koji se sastoji od: DGU-20A jedinice za degasiranje, LC-20AD pumpe, SIL-20A HT autoemplera, CBM-20A kontrolne jedinice, RID-20A detektora indeksa refrakcije, SPD-20AV UV/VIS detektora, CTO-20AC grejne jedinice za kolonu – Shimadzu Corporation, SAD,
- Nucleosil® C18 HPLC kolona – Supelco, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Republika Nemačka,
- centrifuga Sigma 2-16 Benchtop – Njutaun, Velika Britanija,
- centrifuga Eppendorf Centrifuge 5430 R – Eppendorf, Hamburg, Republika Nemačka,
- čitač mikrotitarskih ploča Multiscan GO – Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD,
- autoklav – Sutjeska, SFRJ,
- aparatura za elektroforezu Hoefer™ Mighty Small™ II Mini Vertical Electrophoresis System – Thermo Fisher Scientific, Ričmond, SAD,
- napajanje za elektroforezu EPS 601 – GE Healthcare, Kraljevina Švedska,
- dualni UV-Vis transiluminator MacroVue Uvis-20 – Amersham Biosciences Corp, SAD,
- rotor-stator homogenizator Yellowline DI 25 basic – IKA® Works, Inc., Vilmington, SAD,
- Kjeldal jedinica za digestiju InKjel M – Behr Labor-Technik GmbH, Dizeldorf, Republika Nemačka,
- Ekstraktor za kiselinska isparenja Behrosog 3 – Behr Labor-Technik GmbH, Dizeldorf, Republika Nemačka,
- Jedinica za destilaciju Behr S2 behrotest® – Behr Labor-Technik GmbH, Dizeldorf, Republika Nemačka,
- Infracrveni spektrometar sa Furijeovom transformacijom, FTIR spektrometar Nicolet™ iS™10 – Thermo Scientific™, Inc., Medison, SAD,
- Mixolab® 2 – Chopin Technologies, Vilnev la Gran, Francuska.

8.2. Eksperimentalne metode

8.2.1. Selekcija i skrining mikroorganizama

Kulture *B. subtilis* TMF-1 i *B. cereus* koje su deo kolekcije mikroorganizama Tehnološko-metalurškog fakulteta, katedre za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, su zasejane na tri različite selektivne podloge sa glutenom, čije formulacije su predložili Stresler i saradnici (Stressler, et al., 2015). Na selektivne podloge (Tabela 8.1) sterilnim postupkom su prebačene solitarne kolonije navedenih sojeva, i potom su ploče inkubirane u inkubatoru na 37 °C u periodu od 48h. Ploče na kojima je okom bila vidljiva zona hidrolize glutena (tzv. providna/prozirna zona) korišćene su za dalji rad. Pojava prozirne zone oko izraslih kolonija je znak da odabrani mikroorganizam proizvodi sekundarne metabolite, u ovom slučaju ekstracelularne proteolitičke enzime.

Tabela 8.1. Formulacija selektivnih podloga (SP) (Stressler, et al., 2015).

Hemikalija	Selektivna podloga		
	SP1	SP2	SP3
Gluten, 10,0 g/l	+	+	+
Glukoza, 20,0 g/l	-	+	-
NaCl, 5,0 g/l	-	-	+
CaCl ₂ × 2H ₂ O, 0,06 g/l	-	-	+
Agar, 15,0 g/l	+	+	+

8.2.2. Submerzna fermentacija

Nakon što je utvrđen rast mikroorganizama producenata proteaza na selektivnim podlogama, pokrenuta je submerzna fermentacija šematski ilustrovana na Slici 8.2.1. Solitarna kolonija odabranog mikroorganizma je sa selektivne ploče sterilno preneti u erlenmajere sa 12,5 ml LB medijuma (Tabela 8.2) koji su potom inkubirani u vazdušnoj tresilici. Ovaj postupak pripreme inokuluma izveden je u trajanju od 24 h pri temperaturi od 37 °C i mešanju 160 o/min. Nakon perioda inkubacije i postignutog optimalnog bakterijskog rasta, po 0,25 ml bakterijske starter kulture je prebačeno u erlenmajer sa 25 ml fermentacionog medijuma (GFM – gluten -fermentacioni medijum, Tabela 8.3). Sve podloge (tabela 7.2 i 7.3) su sterilisane na 121 °C, u trajanju od 30 min. Svaki proces fermentacije je urađen u duplikatu. Erlenmajeri sa GFM i bakterijskom kulturom su ostavljeni na tresilici u vremenu od 36 do 48 h, na temperaturi 37 °C pri brzini mešanja 160 o/min. Nakon fermentacije, sadržaj erlenmajera je prebačen u vijale podobne za centrifugiranje, a razdvajanje fermentacione tečnosti i čvrstog ostatka je izvršeno je pri 9000×g u trajanju od 20 min na sobnoj temperaturi.

Tabela 8.2. Formulacija LB medijuma.

Hemikalija	c, g/l
Pepton 1	10,0
Ekstrakt kvasca	5,0
NaCl	5,0

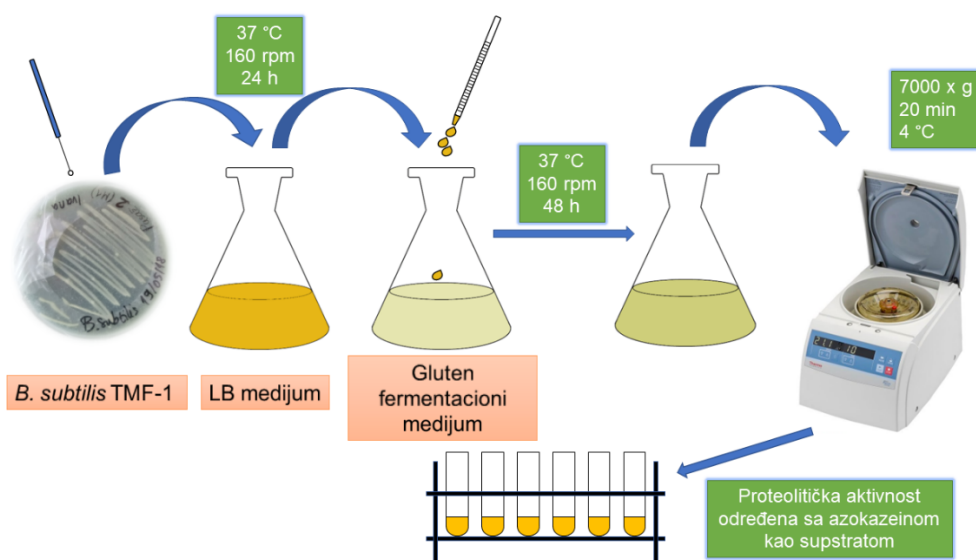
Tabela 8.3. Formulacija Gluten-fermentacionog medijuma (Stressler, et al., 2015).

Hemikalija	c, g/l
Gluten	10,0
Pepton 1	1,0
Na ₂ HPO ₄	0,6
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄ × 7H ₂ O	1,5
CaCl ₂ × 2H ₂ O	2,4
NaCl	1,0

8.2.3. Proteolitička aktivnost dobijenog enzimskog preparata

Proteolitička aktivnost dobijenog enzimskog preparata ispitana je metodom koja je detaljno opisana u radu Salima i saradnika (Salim, et al., 2017). Upotrebom 2% rastvora azokazeina kao supstrata moguće je ispratiti promenu apsorbance na talasnoj dužini 440 nm, a time i količinu novonastalog proizvoda azo boje. Jedna jedinica proteolitičke aktivnosti definisana je kao količina enzima potrebna za promenu apsorbance od 1 na 440 nm u kiveti od 1 cm.

Ukratko, 0,075 ml uzorka enzimskog preparata mešano je sa 0,125 ml prethodno pripremljenog supstrata azokazeina. Epruvete sa reakcionim smešama inkubirane su 30 min na 37 °C. Potom, epruvete su prenete u ledeno kupatilo, dodato je 0,6 ml 10% (w/v) rastvora trihlorsirćetne kiseline čime je zaustavljena reakcija. Centrifugiranjem u trajanju od 10 min pri 8000 o/min izvršena je separacija formiranih precipitata i supernatanta. Supernatant je pažljivo dekantovan mikropipetom i to 0,6 ml, prenet u mikrokivetu za spektrofotometar i direktno u njoj izmešan sa 0,7 ml 1M rastvora NaOH. Uporedo je pripremana i slepa proba, na identičan način samo što je uzorak enzimskog preparata prvo mešan sa trihlorsirćetnom kiselinom, a potom je dodavan supstrat azokazein.



Slika 8.2.1. Šematski prikaz proizvodnje enzima za razgradnju glutena.

8.2.4. Aktivnosti specifičnih proteaza

Metodu za određivanje aminopeptidazne i/ili endopeptidazne aktivnosti dali su El Soda i Desmazo (El Soda i Dezmaséaud) (El Soda & Dezmaséaud, 1982). Supstrati koji se mogu koristiti za ispitivanje specifične aktivnosti proteolitičkih enzima su: Leu-p-NA, Ala-p-NA, Lys-p-NA; Gly-Pro-p-NA, Pro-p-NA. Ukratko, reakcionu smešu činili su 0,1 ml supstrata Gly-Pro-p-NA (16,4 mM u 1ml MeOH), 2,8 ml K-fosfatnog pufera, 0,1 M, pH 6,5 i 0,1 ml enzimskog preparata. Ovako pripremljena reakciona smeša inkubirana je u vodenom kupatilu na 37°C, a kinetika reakcija ispraćena je u različitim vremenskim intervalima. Reakcija je zaustavljena dodatkom 0,5 ml 30% (w/v) rastvora sirćetne kiseline. Promena apsorbance praćena je na 410 nm. Promena 0,01 jedinice apsorbance u jednom minutu ($\Delta A/\Delta t = 0,01$) predstavlja jednu jedinicu enzimske aktivnosti (dipeptidil aminopeptidazne aktivnosti). Specifična aktivnost je definisana kao broj jedinica aminopeptidazne aktivnosti po mg proteina u ekstraktu enzima.

8.2.5. Određivanje sadržaja proteina metodom ukupnog azota – metoda po Kjeldalu

Sadržaj proteina u čvrstim uzorcima netretiranog glutena, netretiranog brašna kao i liofilizovanih uzoraka, modifikovanih mikrotolasnim zraćenjem i/ili ezimskim tretmanom, određen je metodom po Kjeldalu na uređaju za digestiju InKjel M (Behr, Nemačka) opremljenim sa

ekstraktorom za kiselinska isparenja Behrosog 3 i uređaju za desilaciju Behr S2 behrotest®. Uzorci su odmeravani u količinama 0,2–1,0 g i preneseni u epruvete za digestiju. U svaki uzorak je dodato zrnice porcelana koje omogućava ravnomerno ključanje, po 15–20 ml koncentrovane sumporne kiseline i po dve Kjeldal tablete. Nakon pripreme uzorci se stavljaju u uređaj, počinje proces grejanja i potom se upali skruber. Proces digestije traje približno 2h. Nakon digestije, epruvete sa uzorcima su ohlađene do sobne temperature, a zatim je izvršena destilacija azota sa bazom u višku na uređaju za destilaciju. U svaki prihvatni sud (erlenmajer od 250 ml) je sipano 25–30 ml 0,05 M rastvora sumporne kiseline, za koju se vezuje predestilisan amonijak, i 7–8 kapi Taširo indikatora (20 ml 0,04% rastvora metil-crvenog rastvorenog u apsolutnom etanolu i 20 ml 0,02% rastvora metil-plavog rastvorenog u apsolutnom etanolu). Nakon destilacije vršena je povratna titracija sa 0,1 M rastvorom NaOH. Za svaki eksperimentalni set pripremljene su po 2 slepe probe. Svi uzorci su rađeni u duplikatu. Formula po kojoj se izračunava sadržaj ukupnog azota je data jednačinom (6):

$$N(\%) = \frac{(V_{sp} - V_{uz}) \times a \times b \times 100}{m_{uz}} \quad (6)$$

gde su: V_{sp} – ml NaOH utrošeni za titraciju slepe probe, V_{uz} – ml NaOH utrošeni za titraciju uzorka, a – koeficijent kojim se definiše da 1 ml 0,05 M rastvora sumporne kiseline odgovara 0,0014 g azota, b –faktor konverzije sadržaja azota u sadržaj proteina (za pšenično brašno 5,75), m_{uz} – masa odmerenog uzorka.

8.2.6. Određivanje sadržaja proteina metodom po Loriju (Lowry)

Sadržaj rastvorljivih proteina u uzorcima nepoznatih koncentracija određen je prema metodi koju je dao Lori (Lowry) (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951). Priprema reagenasa je izvršena prema sledećem postupku, a bilo je potrebno pripremiti sledeće rastvore:

Rastvor A: 2,0% (w/v) rastvor Na_2CO_3 u 0,1 M rastvoru NaOH,

Rastvor B: 1,0% (w/v) rastvor $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ u destilovanoj vodi,

Rastvor C: 2,0% (w/v) rastvor K,Na-tartarata u destilovanoj vodi,

Rastvor D: pomešati po 1 ml rastvora B i C, dopuniti rastvorom A do 100 ml ukupne zapremine, neposredno pre upotrebe.

F: komercijalni Folin-Ciocalteu reagens (2M), razblažen 1:3.

Postupak za određivanje standardne krive sa goveđim serum albuminom (BSA):

Razblažiti osnovni rastvor proteina koncentracije 1 mg/ml sa destilovanom vodom do ukupne zapremine od 1 ml po epruveti, kao što je prikazano u **Tabeli 8.4**.

Tabela 8.4. Priprema razblaženja goveđeg serum albumina za određivanje standardne prave za određivanje koncentracije proteina.

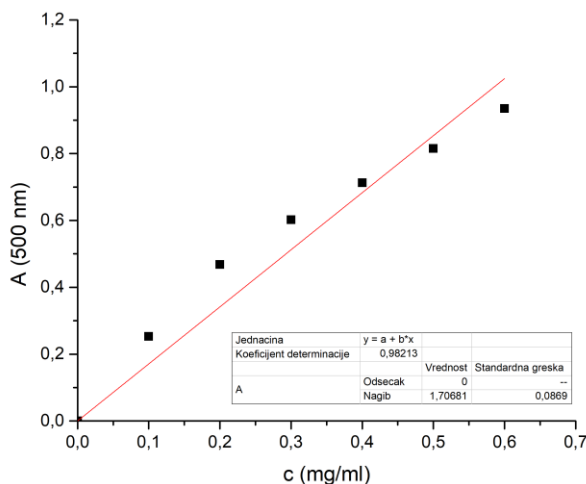
Epruveta	V BSA, ml	V H ₂ O, ml	C _{proteina} , mg/ml
Ø	0	1	0
1	0,1	0,9	0,1
2	0,2	0,8	0,2
3	0,3	0,7	0,3
4	0,4	0,6	0,4
5	0,5	0,5	0,5
6	1,0	0	1,0

Nakon pripremljenih razblaženja kao što je prikazano u tabeli, u svaku epruvetu je zatim dodato po 2 ml reagensa D. Uzorci su inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi (zatvoriti epruvete čepovima). Dodato je potom 0,2 ml reagensa F. Uzorci su inkubirani 45 min na sobnoj temperaturi u mraku (epruvete zatvoriti čepovima). Apsorbanca je izmerena na 500 nm. Standardna prava (**Slika**

8.2.2) je dobijena iz očitanih vrednosti i korišćena je za izračunavanje koncentracije proteina u analiziranim uzorcima. Izračunavanje koncentracije proteina vrši se pomoću jednačine (7):

$$c = \frac{A}{k} \quad (7)$$

gde je c – koncentracija proteina (mg/ml), A – apsorbanca izmerena pri 500 nm, k – nagib standardne prave.

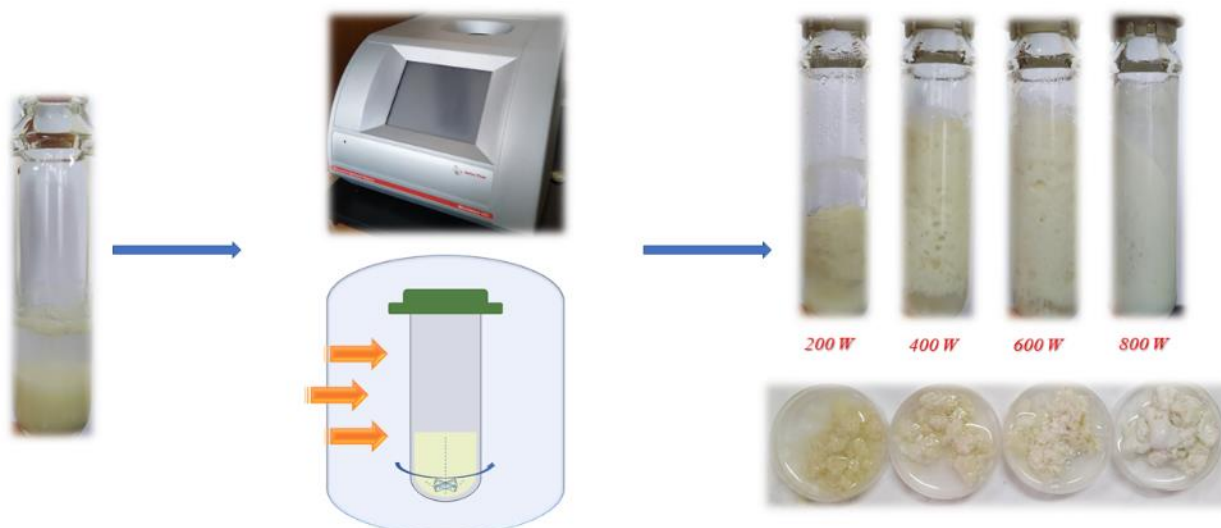


Slika 8.2.2. Prikaz standardne prave metodom po Loriju.

Analiziranje uzoraka nepoznate koncentracije proteina izvršeno je prema prethodno opisanom postupku, pri čemu je umesto standardnog rastvora proteina svaki put mikropipetom odmeren po 1 ml uzoraka.

8.2.7. Tretman u mikrotalasnom reaktoru

Mikrotalasni tretman je izveden pomoću mikroreaktorskog sistema Anton Paar Monowave 300 (Anton Paar GmbH, Grac, Austrija) (Slika 8.2.3). Uzorak sirovog pšeničnog glutena je odmeren u količini od 1 g u staklenoj vijali (G30) i dodata je destilovana voda, a potom su vijale zatvorene odgovarajućim poklopcem kako bi se izbeglo isparavanje uzorka. Nakon toga, uzorak je podvrgnut tretmanu. Tako formirane 10,0% (w/v) suspenzije su tretirane različitim mikrotalasnim snagama, u opsegu 200–800 W uz mešanje koje je bilo konstantno pri 600 o/min. Vreme tretmana je bilo 1 min na zadatoj temperaturi od 100 °C. Uzorci su potom liofilizovani (CHRIST Beta 2-8 LDPlus – CHRIST, Osterode am Harz, Republika Nemačka) i odloženi u dobro zatvorenim plastičnim posudama u eksikatoru na sobnoj temperaturi za dalje strukturne i imunoanalize. Na osnovu rezultata izvedenih ELISA imunotestova, odabrana je jedna mikrotalasna snaga. Nakon toga, odabrana snaga mikrotalasnog tretmana je korišćena u seriji eksperimenata, gde je temperatura kontrolisana i varirana u opsegu 50–100 °C, sa korakom od 10 °C. Brzina magnetnog mešanja i vreme tretmana su bili identični gorenavedenim. Ukupan sadržaj proteina određen je metodom po Kjeldalu ($N \times 5.75$). Svi eksperimenti su izvedeni pri sobnoj temperaturi (~ 25 °C).



Slika 8.2.3. Šematski prikaz mikrotalasnog tretmana u uređaju Anton Paar 300, viala G30.

8.2.8. Konvencionalni toplotni tretman

Toplotni tretman uzoraka sirovog proteina glutena izveden je pomoću jedinice za grejanje (Heidolph MR 3001, Heidolph instruments, Švabah, Republika Nemačka) sa uljanim kupatilom. Pripremljene 10% (w/v) suspenzije pšeničnog glutena su zagrejane u opsegu temperatura 50–100 °C, sa korakom od 10 °C, a magnetno mešanje je bilo podešeno na 600 o/min kako bi se obezbedili uslovi identični opisanim u mikrotalasnom tretmanu (poglavlje 8.2.7). Uzorci su tretirani 1 min na svakoj od željenih temperatura, a uzorci su potom liofilizovani (CHRIST Beta 2-8 LDPlus – CHRIST, Osterode am Harz, Republika Nemačka) i odloženi u plastične posude u eksikator na sobnoj temperaturi za dalje analize.

8.2.9. Enzimaska hidroliza

Enzimaska hidroliza uzoraka glutena, kao model proteina, izvedena je u šaržnom reaktoru sa mešanjem sačinjenog od: staklenog suda zapremine 400 ml (u kojem je radna zapremina iznosila 200 ml), pH elektrode, propelerske mešalice (Heidolph RZR 2020, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Švabah, Republika Nemačka) i magnetne mešalice sa automatskom regulacijom temperature (IKA® C-MAG HS 7, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Štaufen, Republika Nemačka). Broj obrtaja mešalice je bio podešen na 200 o/min u svim eksperimentalnim serijama. Reakcija enzimske hidrolize je praćena pomoću pH-stat metode, pri čemu se stepen hidrolize (*DH*, na engl. Degree of Hydrolysis) i prosečna dužina peptidnih lanaca (*APCL*, na engl. Average Peptide Chain Length) izračunavaju pomoću Adler-Nisen-ovih jednačina (Adler-Nissen, 1986). Jednačina za izračunavanje stepena hidrolize data je u jednačini (8):

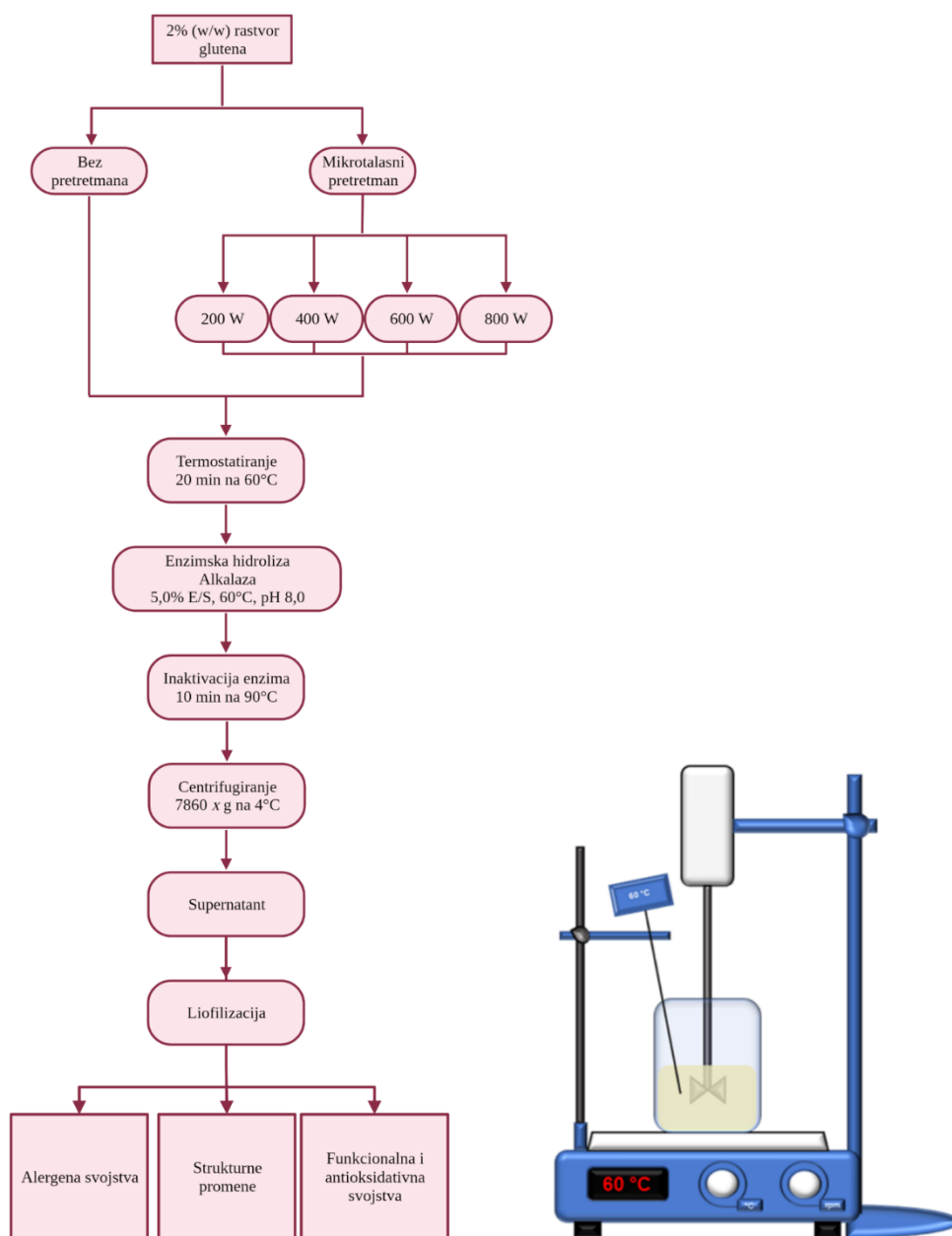
$$DH(\%) = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100 = \frac{N_B \times B \times 100}{\alpha \times m_p \times h_{\text{tot}}} \quad (8)$$

gde je: *h* - broj ekvivalentnih peptidnih veza hidrolizovanih u trenutku *t* izraženi kao meq/g, *h_{tot}* - ukupan broj peptidnih veza u proteinskom supstratu izražen u mmol/g_{proteina} (8,38 za gluten), *B* - utrošak baze (ml), *N_B* - normalitet baze, *α* - prosečan stepen disocijacije NH₂ grupe, *m_p* - masa proteina (g). Tokom hidrolize proteina broj slobodnih α-amino grupa i karbonilnih grupa se povećava. Broj raskinutih peptidnih veza je direktno proporcionalan potrošnji baze tokom titracije.

Prosečna dužina peptidnih lanaca tokom hidrolize izražava se preko jednačine (9):

$$APCL = \frac{100}{DH(\%)} \quad (9)$$

Reakcije hidrolize su završavane onog trenutka kada sistem dostigne plato i kada više nije potrebno dodavati rastvor baze kako bi se održavala željena pH vrednost koja odgovara optimalnom pH radnog enzima. Uzorci su prokuvani u ključalom vodenom kupatilu 10 min, ohlađeni do sobne temperature, a potom centrifugirani pri $7860 \times g$ na 4°C (Eppendorf Centrifuge 5430 R, Hamburg, Republika Nemačka) i supernatanti su liofilizovani (CHRIST Beta 2-8 LDPlus – CHRIST, Osterode am Harz, Republika Nemačka) i odloženi u plastične posude u eksikator na sobnoj temperaturi za dalje analize. Sadržaj proteina svih hidrolizata određen je metodom po Loriju (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951), poglavlje 8.2.6. Kompletan postupak hidrolize koji uključuje i mikrotalasni pretretman je šematski prikazan na **Slici 8.2.4**.



Slika 8.2.4. Šematski prikaz postupka hidrolize glutena sa i bez mikrotalasnog pretretmana (slika kreirana u programu BioRender; „Created with BioRender.com”).

A) Hidroliza mikrotalasno pretretiranih uzoraka sirovog glutena

Odmah nakon tretmana u mikrotalasnom reaktoru (opisano u poglavlju 7.2.7), pripremljene 2,0% (w/w) suspenzije pšeničnog glutena podvrgnute su enzimskoj hidrolizi. Kao kontrolni uzorak,

pripremljena je suspenzija glutena bez pretretmana. Suspenzija je ostavljena da se termostatira 20 min na 60 °C i potom je započeta enzimska hidroliza dodavanjem komercijalne endopeptidaze, Alkalaze, pri čemu je enzim:supstrat odnos (E/S) iznosio 5% (w/w). pH reakcije je podešen na 8 i održavan je konstantnim pomoću 0,8 N rastvora natrijum-hidroksida.

Kako bi se ispitala i pratila specifičnost endopeptidaze Alkalaze prema supstratu glutenu, a samim tim i uticaj dužine peptidnih lanaca na moguće smanjenje alergnosti proteina glutena, pretretiranim i kontrolnim uzorcima su uzorkovani uzorci tokom reakcije hidrolize nakon 45, 90 i 135 min. Svi uzorci su inaktivirani, centrifugirani i liofilizovani kao što je prethodno opisano. U cilju optimizacije i odabira optimalnog postupka hidrolize mikrotalasno pretretiranog glutena tokom preliminarnih eksperimenata ispitani su različiti enzim–supstrat (E/S) odnosi: 1, 5 i 10% kao i različite koncentracije supstrata (S): 1,5 i 10% (w/w).

B) Hidroliza komercijalno pšeničnog brašna bogatog glutenom

Enzimska hidroliza proteina pšeničnog brašna izvedena je korišćenjem komercijalne endopeptidaze Alkalaze pri pH 8 i temperaturi od 60 °C. Suspenzije sirovog brašna (tip “400“, meko, koje sadrže po 9,8 g proteina i 71,9 g ugljenih hidrata u 100 g) pripremljene su u opsegu 5–20% (w/w), pri čemu je radna zapremina iznosila ~200 ml. Reakcija hidrolize izvođena je na isti način kao što je opisano u odeljku 7.2.7.

C) Hidroliza sirovog glutena komercijalnom endo- i endopeptidazom Pronazom

Pripremljena 4% (w/w) suspenzija glutena tretirana je različitim koncentracijama enzima Pronaze. Koncentracije enzima bile su u opsegu 1–10 mg/ml. Reakcija je izvedena pri optimalnim uslovima datim u specifikaciji enzimskog preparata (T 50 °C, pH 8). Za održavanje pH vrednosti korišćen je 0,1 N rastvor NaOH. Pre početka reakcije, rastvor suspenzije i pripremljeni enzim termostatirani su na temperaturi reakcije 20 min.

D) Optimizacija postupka enzimске hidrolize primenom metode odzivnih površina

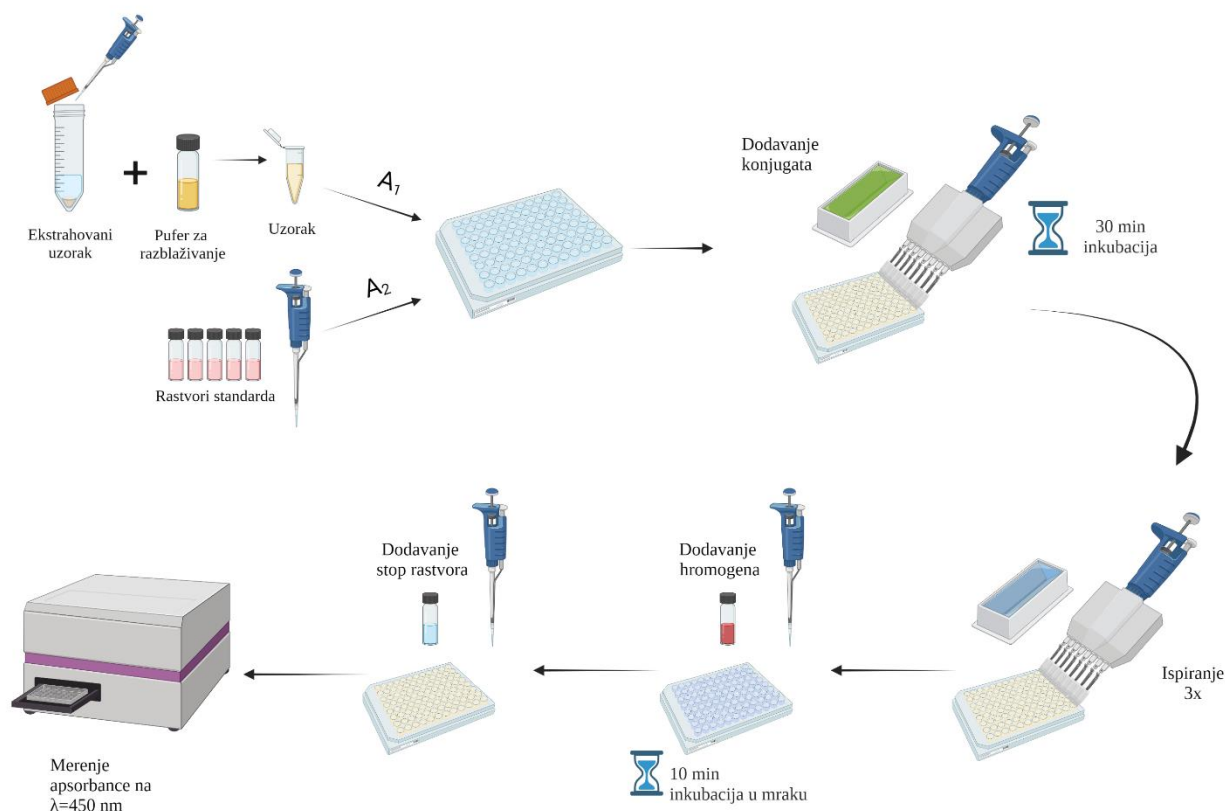
Reakcije enzimске hidrolize pšeničnog brašna bogatog glutenom za potrebe RSM analize (*na engl.* Response Surface Methodology) izvedene su na isti način kao što je prethodno opisano, pri čemu su varirani sledeći parametri: količina unetih proteina u reakciju (1–3 g), pH reakcije (7,0–9,0), temperature reakcije (50–60 °C) i E/S odnos (1,0–10,0% (w/w)).

8.2.10. Određivanje kinetičkih parametara reakcije hidrolize proteina glutena

U cilju boljeg razumevanja i interpretacije dobijenih rezultata, ispitani su kinetički parametri enzimskih reakcija primenom polu-empirijskog kinetičkog modela koji uključuje enzimsku deaktivaciju i inhibiciju supstratom, koji je u skladu sa dostupnom literaturom najzastupljeniji i najadekvatniji model jer vrlo precizno fituje eksperimentalne podatke (Jovanović, et al., 2016a). Nakon izračunavanja kinetičkih parametara, određena je početna brzina enzimске hidrolize glutena pomoću konstante brzine (k_2), konstante inhibicije (K_I) i konstante deaktivacije (k_d).

8.2.11. Kvantifikacija reaktivnih epitopa gliadina

Sadržaj gliadina je određen u netretiranom sirovom glutenu, mikrotalasno tretiranom sirovom glutenu, konvencionalno zagrevanom glutenu i u hidrolizatima glutena (sa i bez mikrotalasnog tretmana) pomoću ELISA RIDASCREEN® Gliadin Competitive kita (R-Biopharm, Darmštat, Republika Nemačka), prema uputstvu koje je dao proizvođač. Na **Slici 8.2.5.** je šematski ukratko prikazan postupak izvođenja testa.



Slika 8.2.5. Šematski prikaz izvođenja kompetitivnog ELISA testa (slika kreirana u programu BioRender; „Created with BioRender.com”).

8.2.12. Određivanje emulgujućih svojstava

Indeks emulzione aktivnosti (*EAI*, na engl. Emulsifying activity index) i indeks emulzione stabilnosti (*ESI*, na engl. Emulsion Stability Index) su određeni metodom koju su dali Pirs i Kinsela (Pearce and Kincella) (Pearce & Kinsella, 1979), uz izmene. Svi sirovi ili liofilizovani uzorci su rastvoreni u destilovanoj vodi tako da formiraju suspenziju krajnje koncentracije 1% (w/v). Radni rastvor se sastojao od $\frac{3}{4}$ rastvorenog uzorka i $\frac{1}{4}$ suncokretovog ulja. Ovakao pripremljen rastvor je potom homogenizovan pomoću laboratorijskog homogenizatora (Yellowline DI 25 basic, IKA® Works, Inc., Vilmington, SAD) u trajanju od 90 s pri brzini od 9 500 o/min. Alikvot od 50 μ l tako homogenizovanog rastvora je potom razblažen 100 puta fosfatnim puferom (0,01 M, pH 7) koji sadrži 0,1% (w/v) SDS. Apsorbanca tako razblažene emulzije je izmerena spektrofotometrijski na 500 nm u nultom trenutku (A_0 , 0 min) i nakon 10 min (A_{10}) na sobnoj temperaturi. Proračuni su dati jednačinama (10)–(12):

$$T = \frac{2.303 \times A}{l} \quad (10)$$

$$EAI \left(\frac{m^2}{g} \right) = \frac{2 \times D \times T}{\varphi \times c \times 10\,000} \quad (11)$$

$$ESI(h) = \frac{A_0 \times \Delta t}{\Delta A} \quad (12)$$

gde je: T – turbidnost, A – apsorbanca izmerena na 500 nm (u nultom trenutku i nakon 10 min), l – optički put, tj. Širina kivete (= 1 cm), D – factor razblaženja (= 100), c – koncentracija proteina u vodenoj fazi pre pripreme emulzije (g/mL), φ – udeo uljane faze u emulziji, $\Delta A = A_0 - A_{10}$ i $\Delta t = 10$ min je vremenski interval.

8.2.13. Kapacitet penjenja i stabilnost pene

Svi uzorci pripremani su kao 2% (w/v) rastvor u destilovanoj vodi prema modifikovanoj metodi (Stefanović, et al., 2018). Početna zapremina od 50 ml za svaki uzorak je zabeležena i potom je rastvor podvrgnut intenzivnom mešanju pomoću laboratorijskog homogenizatora (Yellowline DI 25 basic, IKA® Works, Inc., Vilmington, SAD) u trajanju od 4 min pri 9 500 o/min na sobnoj temperaturi. Isti sud je korišćen za sve uzorke. Odmah nakon mešanja, sud je pokriven parafilmom u cilju sprečavanja kontakta između pene i vazduha. Kapacitet penjenja (*FC*, na engl. Foam capacity) je izračunat kao ekspanzija pene nakon mešanja, i to je prikazano jednačinom (13). Stabilnost pene predstavlja procenat prisutne tečne faze u formiranoj peni 30 min nakon mešanja, čiji je proračun dat jednačinom (14).

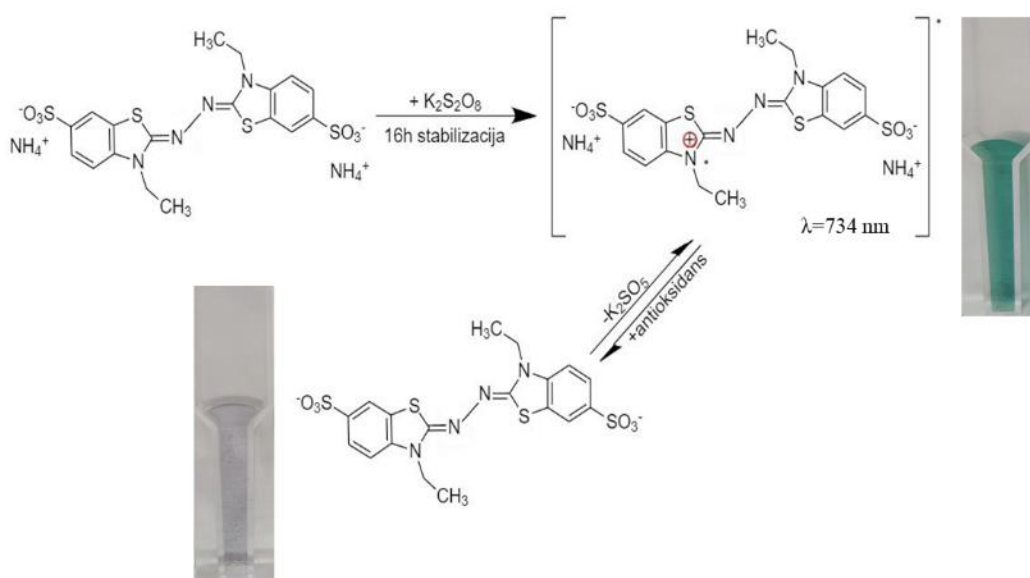
$$FC(\%) = \frac{V_{4 \text{ min}} - V_0 \text{ min}}{V_{4 \text{ min}}} \quad (13)$$

$$FS(\%) = \frac{V_{30 \text{ min}} - V_0 \text{ min}}{V_{30 \text{ min}}} \quad (14)$$

gde je: $V_0 \text{ min}$ – početna zapremina (ml), $V_{4 \text{ min}}$ – zapremina (ml) nakon 4 min mešanja, $V_{30 \text{ min}}$ – zapremina (ml) nakon 30 min stajanja.

8.2.14. Merenje antioksidativne aktivnosti metodom redukcije ABTS radikalskog katjona

Antioksidativna svojstva netretiranog glutena, mikrotalasno pretretiranog glutena, termički tretiranog glutena i hidrolizata proteina glutena (sa i bez mikrotalasnog pretretmana), netretiranog sirovog pšeničnog brašna i hidrolizata pšeničnog brašna određena su pomoću metode redukcije $ABTS^{+\cdot}$ radikalskog katjona, uz neznate modifikacije (Jovanović, et al., 2016b). Spособnost navedenih uzoraka, u ovom slučaju donora elektrona, da redukuju $ABTS^{+\cdot}$ radikalski katjon bazirana je na reakciji obezbojavanja (Slika 8.2.6).



Slika 8.2.6. Šematski prikaz pripreme ABTS radikal katjona i njegova reakcija obezbojavanja sa antioksidansom.

Osnovni 2,5 mM rastvor $ABTS^{+\cdot}$ radikala potreban za reakciju pripremljen je mešanjem 7 mM rastvora ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)-diamonijumove soli) i 140 mM rastvora kalijum-persulfata, i ostavljen u mraku preko noći kako bi se stabilizovao. Tako stabilizovan rastvor radikala je pred upotrebu razblaživan 5 mM PBS puferom pH 7,4 do radne apsorbanace od $0,700 \pm 0,02$, izmerene spektrofotometrijski na 734 nm. Uzorci su pripremani kao

proteinski rastvori koncentracija (0,2–5 mg/ml) u destilovanoj vodi i potom dobro vorteksirani. Potom je 10 μ l pripremljenog proteinskog rastvora pomešano sa 1 000 μ l prethodno pripremljenog i razblaženog rastvora ABTS^{•+} radikala. Uzorci su inkubirani 5 min, nakon čega je izmerena promena apsorbance na 734 nm. Kao kontrolni uzorak pripremljen je uzorak koji je umesto rastvora proteina sadržao rastvor pufera. Kao slepa proba je korišćen rastvor pufera. Antioksidativna aktivnost merena redukcijom ABTS^{•+} radikalskog katjona izračunava se jednačinom (15):

$$ABTS(\%) = \left(1 - \frac{A_{uz}}{A_k}\right) \times 100 \quad (15)$$

gde je: A_{uz} – apsorbanca uzorka proteina u prisustvu ABTS^{•+} i A_k – apsorbanca kontrolnog uzorka u prisustvu ABTS^{•+}.

Minimalna inhibitorna koncentracija (IC_{50}) rastvora proteina potrebna da inhibira 50% ABTS^{•+} radikalskog katjona pri standardnim uslovima, je izračunata i izražena u jedinicama mg/ml.

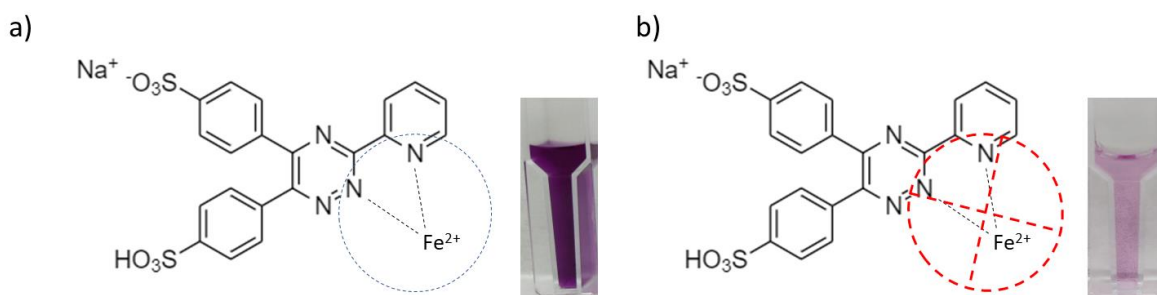
8.2.15. Merenje antioksidativne aktivnosti metodom heliranja jona metala

Sposobnost netretiranog glutena, mikrotalasno pretretiranog glutena, termički tretiranog glutena i hidrolizata proteina glutena (sa i bez mikrotalasnog pretretmana), netretiranog pšeničnog brašna i hidrolizata pšeničnog brašna da heliraju jone metala određene su preko metal-jon helatne aktivnosti (Decker & Welch, 1990). Ova metoda, uz izmene, podrazumeva da pripremljeni rastvori proteina imaju sposobnost da heliraju Fe^{2+} jone i time spreče formiranje ljubičasto obojenog kompleksa između natrijumove soli 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-4',4''-disulfonske kiseline (ferozin) i jona metala (Fe^{2+}) (Slika 8.2.7). Uzorci proteina pripremljeni su kao rastvori proteina u dejonizovanoj vodi (0,2–5 mg/ml) i 200 μ l tako pripremljenih rastvora pomešano je sa 800 μ l dejonizovane vode. Potom je u taj rastvor dodato 100 μ l 2 mM rastvora $FeCl_2$, vorteksirano i inkubirano 3 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga je dodato 200 μ l 5 mM rastvora ferozina, vorteksirano i inkubirano još 10 min. Apsorbance su očitavane spektrofotometrijski na 562 nm, pri čemu je dejonizovana voda korišćena kao slepa proba. Metal-jon helatna aktivnost je izračunata prema jednačini (16):

$$MICA(\%) = \left(1 - \frac{A_{uz}}{A_k}\right) \times 100 \quad (16)$$

gde je: A_{uz} – apsorbanca uzorka proteina u reakciji i A_k – apsorbanca kontrolnog uzorka u reakciji gde je umesto proteina prisutna dejonizovana voda.

Minimalna inhibitorna koncentracija (IC_{50}) rastvora proteina potrebna da helira 50% jona Fe^{2+} pri standardnim uslovima, je izračunata i izražena u jedinicama mg/ml.



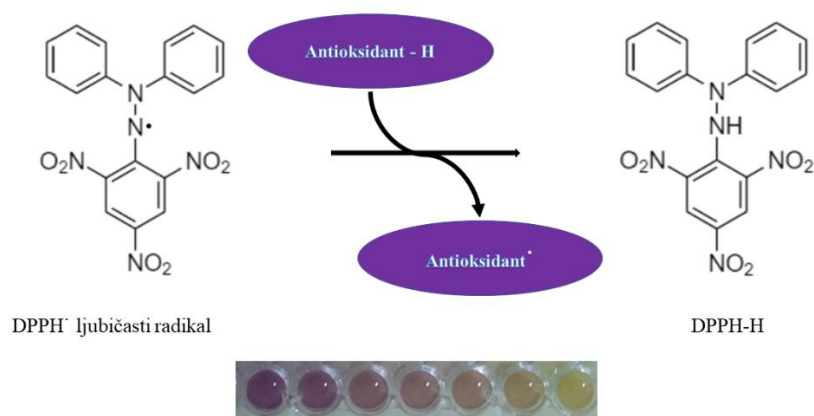
Slika 8.2.7. a) Atomi azota u ferozinu koji reaguju sa Fe^{2+} , pri čemu formiraju kompleks ljubičastog obojenja, b) Antioksidativno sredstvo sprečava formiranje kompleksa Fe^{2+} -ferozin.

8.2.16. Merenje antioksidativne aktivnosti metodom neutralizacije DPPH radikala

Slobodni DPPH[•] radikal predstavlja dugotrajan radikal organskog azota tamno ljubičaste boje. Kada se rastvor pripremljenog DPPH radikala pomeša sa supstancom koja poseduje antioksidativna svojstva, boja prelazi iz tamno ljubičaste u žućkastu (**Slika 8.2.8**). Ovaj test se primenjuje kao standardna procedura za merenje antioksidativne aktivnosti odabrane supstance (Jovanović, et al., 2016b). Redukcija pripremljenog radikala prati se spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na 517 nm. Ukratko, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil rastvoren je u metanolu tako da formira 0,15 mM rastvor DPPH[•] radikala. Hidrolizati proteina glutena rastvoreni su pri koncentraciji proteina od 0,5–10 mg/ml. Po 150 µl rastvora proteina pomešano je sa isto toliko pripremljenog rastvora DPPH[•]. Za svaki uzorak posebno je pripremljen „korekcion“ uzorak rastvora proteina sa metanolom u istom odnosu. Kao kontrolni uzorak pripremljen je uzorak koji nije sadržao rastvor proteina, već samo metanol i DPPH[•]. Nakon mešanja rastvora radikala i proteinskog rastvora, uzorci su vorteksirani i ostavljeni u mraku 30 min. Nakon toga je spektrofotometrijski očitana apsorbance, i izračunat stepen neutralizacije DPPH[•] radikala pomoću jednačine (17):

$$DPPH(\%) = \left(1 - \frac{A_{uz} - A_{kor}}{A_k}\right) \times 100 \quad (17)$$

gde je: A_{uz} – apsorbance rastvora proteina sa DPPH[•], A_{kor} – apsorbance proteina sa metanolom, A_k – apsorbance kontrolnog DPPH[•] uzorka.



Slika 8.2.8 Mehanizam redukcije DPPH[•] radikala do DPPH-H pomoću antioksidansa (donora atoma H).

8.2.17. Kvantifikacija ukupnih i reaktivnih sulfhidrilnih grupa

U cilju ispitivanja uticaja mikrotalasnog pretretmana na potencijalnu promenu strukture glutena kao model proteina, meren je sadržaj ukupnih i reaktivnih sulfhidrilnih grupa u uzorcima koji su pretretirani mikrotalasima i onih koji su tretirani konvencionalnim toplotnim tretmanom. Ova spektrofotometrijska metoda podrazumeva korišćenje 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeve kiseline) (DTNB), tj. Elmanovog reagensa (Shimada & Cheftel, 1988; Stefanović, et al., 2014). DTNB reaguje sa dostupnim, tj. izloženim SH grupama i daje proizvod sa maksimumom apsorbance na 412 nm.

8.2.18. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

FTIR spektri uzoraka proteina glutena (netretiranog glutena, mikrotalasno pretretiranog glutena, termički tretiranog glutena i hidrolizata proteina glutena sa i bez mikrotalasnog pretretmana, netretiranog sirovog pšeničnog brašna i hidrolizata pšeničnog brašna) snimani su na FTIR

spektrometru Nicolet iS10 (Thermo Scientific™, Inc.) povezanog na računar sa softverskim paketom za obradu spektara.

Praškasti uzorak nanet je špatulicom na merno sočivo i spektri apsorbanca su izmereni pri rezoluciji od 4 cm^{-1} u opsegu talasnih dužina $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$. Spektri apsorbanca su korigovani izmerenim referentnim spektrom vazduha. Sve analize su izvedene na sobnoj temperaturi.

Kako bi se detaljnije ispitala promena strukture u navedenim uzorcima, izvršena je dekonvolucija spektara u računarskom programu OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation, Northampton, SAD). Postupak dekonvolucije izmerenog spektra izveden je na sledeći način/sastojao se od sledećih koraka:

Na osnovu unetih vrednosti apsorbanca koje odgovaraju određenim talasnim brojevima, odabrana je Amid I regija izmerenog spektra, i pomoću opcije Peak analyzer odabrana je opcija Fit Peaks Pro. Nakon toga je postavljena bazna linija čime je srazmerno korigovan spektar. Pikovi su traženi upotrebom drugog izvoda, metodom Savicki–Golaj (*na engl.* Savitzky–Golay), polinomom drugog reda i 30 tačaka. Fitovanje podataka je vršeno Gausovom metodom. Na osnovu dobijenih fitovanih pikova, formirani su rezultati koji odgovaraju procentnom udelu određenih konformacija proteina u zavisnosti od regije talasnog broja kom pripada, a sve to gledano u odnosu na ukupnu površnu.

8.2.19. SDS-PAGE elektroforeza

U cilju provere efekta mikrotalasnog pretretmana na strukturu proteina glutena kao i efekta enzimskog preparata na proizvodnju hidrolizata smanjene alergenosti (kod enzimski hidrolizovanog netretiranog glutena, mikrotalasnog pretretiranog glutena, hidrolizovanog brašna), izvršeno je razdvajanje proteinskih frakcija po molekularnoj masi primenom natrijum-dodecilsulfat-poliakrilamidne gel elektroforeze (*na engl.* SDS-PAGE) koju je opisao Lemli (Laemmli) (Laemmli, 1970) uz izmene.

SDS-PAGE gel elektroforeza uzoraka je izvedena upotrebom 12% poliakrilamidnih gelova za razdvajanje (Precise™ Protein Gels, Thermo Scientific, Rokford, SAD) na vertikalnom sistemu (Hofer™ Mighty Small™ II Mini Vertical Electrophoresis Systems) za elektroforezu. Uzorci proteina i pufer za uzorke, koji sadrži DTT, su pomešani u odnosu 1:1 i stavljeni u ključalo vodeno kupatilo 5 min. Redukovani uzorci ($20\text{ }\mu\text{l}$) su naneti na gel za razdvajanje. Razdvajanje je izvedeno pod strujom jačine 40 mA u vremenu od 120 min. Standard proteina koji je korišćen za analizu dobijenih frakcija je Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific), koji sadrži 10 različito obojenih proteina sa molekularnim masama u opsegu 10–260 kDa.

Postupak elektroforeze se odvijao u nekoliko faza, među kojima je i priprema pufera za uzorke i elektroforezu i rastvora za bojenje i obezbojavanje, što je dato u **Tabelama 8.5–7**. Ploče sa gelovima su prvo postavljene u kadicu za elektroforezu i pričvršćene klemama, a potom je pufer za elektroforezu naliven u kadicu i do vrha gelova.

Tabela 8.5 Receptura za pravljenje pufera za uzorke proteina.

Pufer za uzorke proteina	
2x Tris-HCl pufer	2,50 ml
Glicerol	2,00 ml
10% rastvor SDS-a	4,00 ml
5% rastvor bromfenol plavog	0,40 ml
1 M rastvor ditiotreitol	2,00 ml

Nakon toga, prethodno pripremljeni uzorci su naneti, postavljen je poklopac povezan sa izvorom napajanja EPS 601 (GE Healthcare, Kraljevina Švedska). Neposredno pre puštanja struje bilo je potrebno podesiti parametre protoka struje koji će se održavati do kraja procesa razdvajanja. Razdvajanje je završeno kada se vidljive trake nalaze oko 0,5 cm do kraja ploče sa gelom. Nakon isključivanja sa izvora struje, gel je ispran sa destilovanom vodom kako bi se uklonio zaostali SDS i

potom je ostavljen u rastvoru za bojenje (**Tabela 8.7**) oko 10 min. Nakon bojenja sledio je proces obezbojavanja (**Tabela 8.7**) koji je vršen oko 30-60 min uz povremenu izmenu rastvora za obezbojavanje. Gel je nakon toga slikan i dalje analiziran pomoću položaja traka koje odgovaraju standardima proteina.

Tabela 8.6. Receptura za pravljenje pufera za elektroforezu.

Pufer za elektroforezu		
Komerrijalni Tris-HEPES-SDS pufer pH 8,0		
Napomena: Pufer je potrebno razblažiti 10x pre upotrebe. Čuvati u frižideru na 4 °C.		

Tabela 8.7. Receptura za pravljenje rastvora za bojenje i obezbojavanje.

Rastvori za bojenje i obezbojavanje		
Reagensi	Rastvor za bojenje	Rastvor za obezbojavanje
Metanol:voda = 1:1 v/v	90ml	90ml
Glacijalna sirćetna kiselina	10ml	10ml
Coomassie Brilliant Blue R-250	0,25 g	/
Napomena: rastvore pripremati neposredno pred upotrebu		

8.2.20. Površinski napon i zeta potencijal

Površinski napon i zeta potencijal uzoraka pripremljenih kao 0,2% rastvor proteina su mereni na Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) sa automatskom titracijom koristeći univerzalnu ćeliju (**Slika 8.2.9**). Sveže pripremljeni uzorci glutena su razblaživani i profiltrirani kroz 0,45 µm filter. pH vrednost rastvorenih uzoraka je bila oko 8. Aproximacija po Smolučovskom (Smoluchowski) je korišćena kako bi se elektroforetska pokretljivost prevela u zeta potencijal pomoću Smolučovski jednačine (**Stefanović, et al., 2018**). Vrednosti veličina proteina, prikazanih kao srednja Z-vrednost (*na engl. Z-average*) i profil raspodele veličina, prikupljeni su pomoću merenja dinamičkog rasejanja svetlosti na istom uređaju. Merenja su vršena u triplikatu.



Slika 8.2.9. Uređaj za merenje naelektrisanja i veličine čestica Zetasizer (Malvern Instruments).

8.2.21. RP-HPLC analiza

Hromatografska metoda korišćena za analiziranje i poređenje uzoraka data je uradu Ivaniak i saradnika (Ivaniak et al.) (**Ivaniak, Hryniewicz, Minkiewicz, Bucholska, & Darewicz, 2020**). Liofilizovani hidrolizati, liofilizovani pretretirani gluten i netretirani gluten i gliadin su rastvoreni u

300 μ l pufera (0,1 M Bis-Tris i 4 M urea). Uzorci su vorteksirani i potom im je dodato 2 μ l 2-merkaptetanola, snažno vorteksirani i potom ostavljeni da se inkubiraju na sobnoj temperaturi 1h. Nakon toga, 680 μ l rastvora 6 M uree u mešavini acetonitrila i vode (v/v; 100:900; pH 2,2 podešen pomoću trifluorsirćetne kiseline) je dodato u prethodno pripremljeni rastvor proteina i vorteksirano. Uzorci su centrifugirani 10 min pri $10\,000 \times g$. Svi uzorci su pre nanošenja na kolonu profiltrirani kroz filter sa veličinom pora 0,45 μ m. Za analizu uzoraka korišćene su sledeće mobilne faze: rastvarač A 0,01% (v/v) vodeni rastvor trifluorsirćetne kiseline, rastvarač B 0,01% (v/v) rastvor trifluorsirćetne kiseline u acetonitrilu. Metoda za razdvajanje je optimizovana tako da je ukupno retenciono vreme za pojedinačan uzorak iznosio 80 min. Elucija je izvršena na sledeći način: 0–60 min gradijent od 0 do 40% B, zatim 60–65 min gradijent od 40 do 100%, zatim 65–70 min izokratski 100% B, 70–71% gradijent od 100 do 0% B i 71–80 min izokratski 0% B. Uzorci su injektovani pri zapremini od 30 μ l, protok mobilne faze je bio podešen na 200 μ l /min, a kolona je termostatorirana na 30 °C. Svi hromatogrami su prikupljeni pri 220 nm. Sve analize su izvedene na Shimadzu® uređaju za tečnu hromatografiju visokih performansi koji se sastojao od: DGU-20A jedinice za degasiranje, LC-20AD pumpe, SIL-20A HT autosemplera, CBM-20A kontrolne jedinice, SPD-20AV UV/VIS detektora, CTO-20AC grejne jedinice za kolonu. Korišćena je reverzno fazna kolona Nucleosil® C18 HPLC kolona (Supelco, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Nemačka; 125 \times 4,6 mm; prečnik čestice 5 μ m; prečnik pore: 100 Å).

8.2.22. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti hidrolizata proteina glutena

Antimikrobna aktivnost predstavlja mogućnost pripremljenog hidrolizata prečišćenog glutena ili glutena iz pšeničnog brašna da difunduje kroz tripton-soja agarnu (TSA) ploču. Pripremljene TSA ploče su naknadno prelivene mekim tripton soja agarom inokulisanim sa kulturom patogena. Bunarčići su formirani upotrebom keramičkih cilindara, prečnika 8 mm, koji su postavljeni su na čvrsti TSA. U tako formirane bunarčiće se potom sipa hidrolizat proteina. Za određivanje antimikrobne aktivnosti hidrolizata proteina glutena/brašna korišćeni su standardni sojevi patogena, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 i *C. albicans* ATCC 24433. Postupak određivanja antimikrobne aktivnosti je obavljen na sledeći način:

Prvo je bilo potrebno pripremiti sve neophodne podloge:

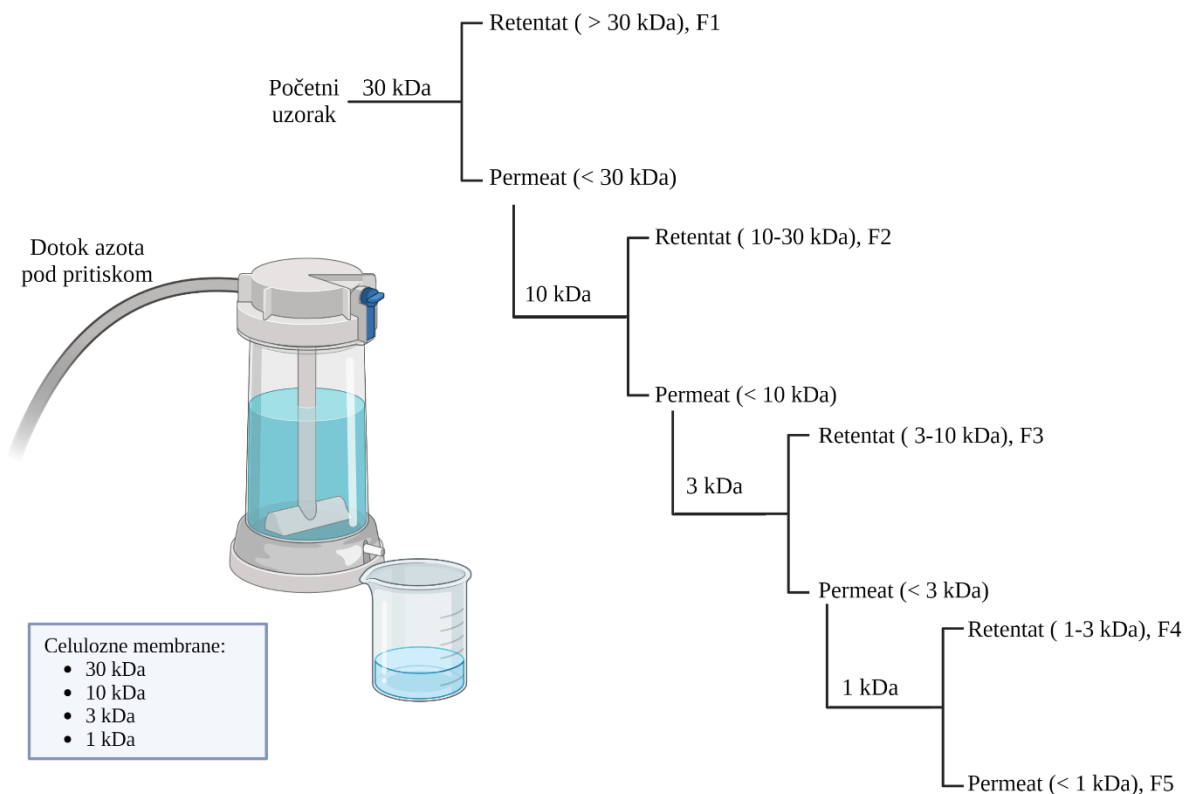
1. tripton-soja bujon (komercijalni) sa 6 g/l kvašćevog ekstrakta,
2. tripton-soja bujon (komercijalni) sa 6 g/l kvašćevog ekstrakta i 18 g/l agara,
3. tripton-soja bujon (komercijalni) sa 6 g/l kvašćevog ekstrakta i 6 g/l agara.

Odabrane mikrobne kulture umnožene su u inkubatoru na 37 °C u podlozi 1. Nakon toga razlivena je podloga 2 u ploče i ostavljeno je da se stegne. U ovako pripremljene ploče sterilno su poređani bunarčići i zalivene su prethodno pripremljenim podlogama sa patogenima (podloga 3). Kada se podloga sa patogenima stegla, bunarčići su pažljivo uklonjeni i u svaki od njih sipano je 50–100 μ l uzorka hidrolizata proteina glutena. Ploče su inkubirane 24 h na 37 °C. Provedna zona oko bunarčića je indikator da testirani uzorak poseduje mogućnost inhibicije rasta odabranih mikrobnih kultura.

8.2.23. Frakcionisanje hidrolizata glutena postupkom ultrafiltracije

Pripremljeni kontrolni hidrolizat glutena i mikrotalasno pretretirani (200 W) hidrolizat glutena su dalje frakcionisani postupkom ultrafiltracije. Pomoću ultrafiltracione čaše sa magnetnim mešanjem (Millipore, model 8050 1 jedinica, Millipore Corporation, Bedford, SAD) priključene na bocu sa azotom pomoću koje se obezbeđuje pritisak od 2,76 bar i različitih celuloznih membrana (30, 10, 3 i 1 kDa) uzorci su propuštani postupno i prikupljeni su permeati i retentati oba uzorka nakon svake membrane. Početni korak frakcionisanja podrazumevao je propuštanje 50 ml uzorka hidrolizata kroz membranu najveće veličine pora (30 kDa). Potom su uzorci propuštani redno kroz membrane opadajućih veličina pora. Nakon svake upotrebe membranu u čaši je bilo neophodno isprati 0,1 M rastvorom NaOH, a potom i destilovanom vodom. Permeatu i retentatu svakog uzorka nakon svake

membrane je ispitan sadržaj proteina metodom po Loriju i frakcije su sačuvane kako bi se naknadno ispitala antioksidativna svojstva (*DPPH*, *ABTS*) i metal-jon helatna svojstva (*MICA*) svake frakcije. Šematski prikaz postupka razdvajanja uzorka na frakcije prikazan je na **Slici 8.2.10**. Prikupljene frakcije su obeležene oznakom F (1–5).



Slika 8.2.10. Šematski prikaz postupka razdvajanja frakcija hidrolizata glutena pomoću celuloznih membrana različitih veličina pora (1-30 kDa) (slika kreirana u programu BioRender; „Created with BioRender.com”).

8.2.24. Studija optimizacije postupka hidrolize proteina pšeničnog brašna

Uticaj procesnih parametara na antioksidativna i alergena svojstva proteina pšeničnog brašna ispitani su pomoću eksperimentalnog dizajna, konkretno primenom Box-Behnken statističkog dizajn modela. Uticaj četiri različita procesna parametra na odabrana funkcionalna i alergena svojstva hidrolizata dobijenih pomoću enzimske hidrolize proteina pšeničnog brašna Alkalazom ispitani su pomoću variranja pH vrednosti (*A*; 7-9), temperature (*B*; 50-60 °C), enzim-supstrat odnosa (*C*; 1,0-10,0%) i sadržaja proteina (*D*; 1,0-3,0 g). Stepenn hidrolize (*DH*, %), alergenost (mg/kg), *ABTS* (%) i *MICA* (%) su uzeti za odzivne varijable, i njihove vrednosti za pripremljene uzorke ispitane su prema prethodno opisanim metodama (poglavlja: 7.2.9, 7.2.14, 7.2.15). Nasumičnim redosledom, 29 nezavisnih eksperimenata je izvedeno u cilju razvoja matematičkog modela, prikazanog u **Tabeli 8.8**. Dobijeni rezultati su obrađeni pomoću polinoma drugog reda, predstavljenog jednačinom (18):

$$y = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^4 \beta_{ki}X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{kii}X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{kij}X_iX_j \quad (18)$$

gde su β_{k0} , β_{ki} , β_{kii} i β_{kij} regresioni koeficijenti za odsečak, linearnu, kvadratnu i međusobnu interakciju, respektivno, dok su X_i i X_j nezavisne promenljive. Koeficijenti odzivne funkcije su određeni pomoću regresione analize odzivnih površina – softvera u programu Design Expert 8.0.

Tabela 8.8. Eksperimentalna postavka Box-Behnken modela za 3 nivoa i 4 faktora, sa ukupno 29 eksperimentalnih tačaka.

Faktor	Simbol	Nivo		
		-1	0	1
pH	A (X ₁)	7,0	8,0	9,0
Temperatura, °C	B (X ₂)	50	55	60
E/S, %	C (X ₃)	1,0	5,5	10,0
S, g	D (X ₄)	1,0	2,0	3,0

8.2.25. Miksolab analiza

Termo-mehanička svojstva odabranog heljdinog integralnog brašna, heljdinog integralnog brašna supstituisanog sa 1% i 5% hidrolizata brašna HB 15% (w/w) ispitana su upotrebom uređaja Mixolab® (Chopin Technology, Francuska) primenom modifikovanog *Chopin+* protokola (Tabela 8.9). Ciljana vrednost konzistencije zamese postavljena je na $C1=1,1 \pm 0,05$ Nm, dok je brzina obrtaja smanjena na 60 rpm, a masa testa povećana na 90g.

Tabela 8.9. Parametri modifikovanog *Chopin+* protokola.

Modifikovani <i>Chopin+</i> protokol	
Brzina mešanja	60 rpm
Ciljana konzistencija (C1)	1,1 Nm
Težina formiranog testa	90 g
Temperatura ulazne vode	30 °C
Temperatura tokom prve faze	30 °C
Vreme trajanja prve faze	8 min
Temperatura druge faze	90 °C
Prvi temperaturni gradijent	4 °C/min
Vreme trajanja druge faze	7 min
Drugi temperaturni gradijent	-4 °C/min
Temperatura treće faze	50 °C
Vreme trajanja treće faze	5 min
Ukupno vreme analize	45 min

8.2.26. Statistička obrada eksperimentalnih podataka

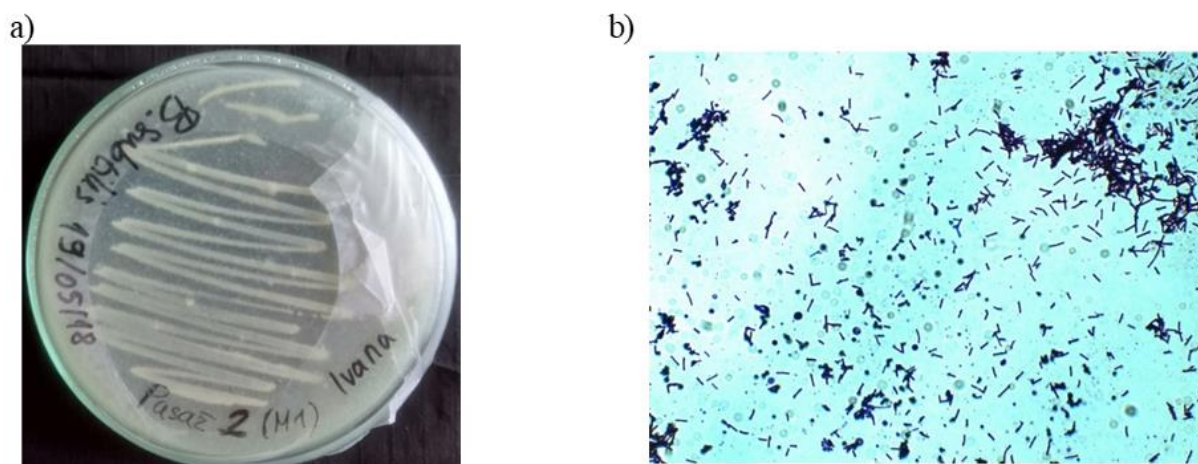
Svi eksperimentalni podaci obrađeni su pomoću OriginPro 9.0 programa (OriginLab Corporation, Northampton, SAD). Dva nezavisna eksperimenta su izvedena za svaku eksperimentalnu postavku (mikrotalasno ili toplotno tretirani uzorci, enzimska hidroliza) i rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije. Primenjen je statistički test Jednosmerna ANOVA sa ponovljenim merenjima (unutar subjekata) (*na engl.* One-way ANOVA with repeated measures (within subjects)) praćen Tuki (Tukey) testom kako bi se utvrdila statistički značajna razlika između primenjenih tretmana glutena, na nivou manjem od 0,05. Nasuprot tome, jednosmerna ANOVA praćena Tuki testom je korišćena kako bi se ispitala veza između ispitivanih parametara, na primer, zavisne varijable dva ili tri tehnička replikata za test alergnosti i antioksidativne i funkcionalne analize, respektivno (nivo značajnosti $p < 0,05$).

9. Rezultati i diskusija

9.1. Selekcija proizvodnog mikroorganizma producenta proteaza

Prvi korak u analizi mogućnosti mikroorganizama da proizvodi željene proteolitičke enzime je početni skrining velikog broja različitih komercijalnih i prirodnih sojeva. Različiti sojevi, komercijalni i prirodni izolati iz različitih staništa, testirani su na sposobnost da proizvode ekstracelularne proteaze. U tu svrhu korišćene su ploče sa selektivnim agarnim podlogama bogatim glutenom, jer takvi medijumi zahtevaju aktivnost ekstracelularnog enzima da bi se olakšala uspešna hidroliza i korišćenje hranljivih materija iz medijuma i pospešio rast mikroorganizama. Nakon preliminarne selekcije proizvodnih mikroorganizama, pažljivo je optimizovana proizvodnja ekstracelularnih proteaza i to ispitivanjem uticaja sastava hranljive podloge (izvor ugljenika i izvor azota), i uslova rasta (pH, T).

Konkretno u prvoj fazi istraživanja, *B. subtilis* TMF-1 i *B. cereus* su striklovani na tri različite selektivne agarne podloge, tj. tri različite formulacije podloge. Iako su oba testirana mikroorganizma pokazala rast na selektivnim podlogama, *B. cereus* je isključen iz daljih analiza usled vidno slabijeg rasta na odabranim podlogama. Najbolji rezultat postignut je na selektivnoj agarnoj podlozi koja je sadržala 10 g/l glutena i 15 g/l agara. Rast *B. subtilis* TMF-1 na podlozi SP1 prikazan je na **Slici 9.1.1**. Providna zona oko zone rasta je indikator prisustva proteaza usled mikrobne asimilacije glutena za sopstveni rast i razvoj. Ovaj izolat je pokazao odličan rast na ploči iste formulacije kao i izolat *B. subtilis* koji su izolovali Stresles i saradnici (Stressler, et al., 2015).



Slika 9.1.1. a) Rast *B. subtilis* TMF-1 na agarnoj ploči sa glutenom; b) mikroskopski prikaz *B. subtilis* TMF-1.

Poređenjem rezultata rasta pomenutog izolata sa rastom na pločama koje su osim glutena sadržale još soli i glukoze, primećeno je da je rast najbolji na ploči koja je sadržala samo gluten. Ovo se može objasniti činjenicom da izolat proizvodi za gluten specifične proteaze, i da mu je za rast dovoljno prisustvo samo glutena.

9.1.1. Uticaj sastava podloge na proizvodnju proteaza

Uticaj sastava fermentacione podloge (medijuma) za proizvodnju proteaza je analiziran pripremanjem medijuma sa različitim koncentracijama glutena. Naime, 0–10 g/l glutena je dodavano u podlogu, dok su koncentracije ostalih komponenti zadržane na istom nivou. Promenom koncentracije samo jednog parametra, ispitan je uticaj početne koncentracije glavnog izvora hranljivih materija na proizvodnju enzima. pH vrednost podešena za rast odabranog soja *B. subtilis* TMF-1 je bila 7, a erlenmajeri su ostavljeni 48 h u tresilici. Nakon 48 h fermentacije na 37 °C

supernatanti su odvojeni i analizirani kao sirovi enzimski ekstrakti. Sirovom enzimskom preparatu je ispitana proteolitička aktivnost, metodom sa azokazeinom i određen sadržaj proteina metodom po Loriju kao što je opisano u metodama 8.2.6. Rezultati ovih merenja su prikazani u **Tabeli 9.1**.

Tabela 9.1 Aktivnost proteaza (U/ml) i specifična aktivnost proteaza (U/mg) u sirovom enzimskom preparatu nakon 48 h inkubacije na 37 °C pri različitom sadržaju glutena (0–10 g/l).

Pšenični gluten, g/l	Aktivnost proteaze, U/ml	Specifična aktivnost proteaze, U/mg
10	2,58 ± 0,040 ^a	0,85 ± 0,024 ^a
5	2,51 ± 0,180 ^a	1,25 ± 0,009 ^a
1,0	1,22 ± 0,126 ^b	1,37 ± 0,129 ^a
0,50	0,84 ± 0,333 ^{bc}	1,02 ± 0,385 ^a
0,25	0,51 ± 0,239 ^c	0,75 ± 0,352 ^a
0	0,58 ± 0,219 ^c	0,96 ± 0,389 ^a

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardna devijacija ($n=3$). Srednje vrednosti sa različitim slovima u istoj koloni se značajno razlikuju ($p < 0,05$).

U formulaciji podloge u kojoj se nalazilo 10 g/l glutena je zabeležena najviša aktivnost proteaze, $2,58 \pm 0,040$ U/ml. Interesantno je prokomentarisati činjenicu da je određena aktivnost proteaza zabeležena i u onim formulacijama u kojima je bilo samo 0,25 g glutena ($0,51 \pm 0,239$ U/ml), kao i u podlozi gde glutena nije bilo ($0,58 \pm 0,219$ U/ml). U svim formulacijama podloge sadržaj peptona je bio 1 g/l. Na osnovu prikazanih rezultata u **Tabeli 9.1** može se zaključiti da je 5–10 g/l glutena dovoljno da mikroorganizam producent proizvodi veću količinu ekstracelularnih proteaza. Niske vrednosti proteolitičke aktivnosti su zabeležene u sirovim ekstraktima sa sadržajem glutena 0–0,5 g/l, što je direktan pokazatelj da je mikroorganizam maksimalno iskoristio sve dostupne izvore azota i ugljenika za svoj rast tokom 48 sati fermentacije. Interesantno je istaći da je najviša specifična aktivnost zabeležena u eksperimentalnom setu u kom je podloga sadržala 1 g/l glutena ($1,37 \pm 0,139$ U/mg). Sve navedeno direktan je pokazatelj da soj *B. subtilis* TMF-1 ima sposobnost proizvodnje ekstracelularnih proteaza. Ovo je pokazatelj da ovaj konkretan soj ima sposobnost proizvodnje proteaza.

Sledeći nezavisni eksperimentalni set izveden je pri fiksiranoj koncentraciji glutena od 10 g/l, dok je sadržaj peptona variran u opsegu 0–1 g/l. Svi ostali parametri zadržani su pri istim koncentracijama. Rezultati dobijeni nakon analiza prikazani su u **Tabeli 9.2**.

Tabela 9.2. Aktivnost proteaza (U/ml) i specifična aktivnost (U/mg) sirovog enzimskog ekstrakta nakon 48 h inkubacije na 37 °C pri različitom sadržaju peptona (0–1 g/l).

Pepton, g/l	Aktivnost proteaze, U/ml	Specifična aktivnost, U/mg
1	3,02 ± 0,090 ^a	0,94 ± 0,087 ^a
0,75	3,03 ± 0,134 ^a	0,98 ± 0,059 ^a
0,50	2,78 ± 0,060 ^a	0,90 ± 0,100 ^a
0,25	2,73 ± 0,137 ^a	0,88 ± 0,042 ^a
0	2,26 ± 0,120 ^b	0,73 ± 0,117 ^a

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardna devijacija ($n=3$). Srednje vrednosti sa različitim slovima u istoj koloni se značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Sumirajući rezultate iz **Tabele 9.2**, najviša proteolitička aktivnost izmerena pri koncentraciji peptona 1 i 0,75 g/l je bila $3,02 \pm 0,090$ i $3,03 \pm 0,134$ U/ml, redom. Međutim, značajna razlika u vrednostima proteolitičke aktivnosti pri koncentracijama peptona 0,25–1,00 g/l nije zabeležena. Značajna razlika je zabeležena prilikom odsustva peptona u hranljivoj podlozi.

Prisustvo peptona u konstantnoj koncentraciji od 1 g/l se pokazalo da ima pozitivan uticaj na proizvodnju proteaza u poređenju sa eksperimentalnim setovima gde je koncentracija peptona varirana. Sveobuhvatno, na osnovu prikazanih rezultata iz Tabele 8.2 može se zaključiti da je promena koncentracije peptona veoma učinkovita kada je reč o postignutoj proteolitičkoj aktivnosti. Naime, čak i minimalna koncentracija peptona od 0,25 g/l je dovoljna da mikroorganizam proizvede željenu proteazu. Iako je rezultat specifičnih aktivnosti bio niži od ostalih u tom eksperimentalnom setu, ipak je skoro jednak onom postignutom sa 10 g/l glutena i 1 g/l peptona. Time je utvrđeno da je 0,25 g/l peptona dovoljno da se postignu zadovoljavajući rezultati. Stoga, 5–10 g/l glutena i 0,25 g/l peptona je dovoljno uneti u hranljivu podlogu kako bi se indukovala proizvodnja proteaze pomoću *B. subtilis* TMF–1. Smanjenjem količine peptona koji se dodaje u podlogu postižu se uštede u potrošnji.

9.1.2. Uticaj pH na proizvodnju i aktivnost proteaza

Uticaj pH vrednosti fermentacionog medijuma na produkciju proteaza je ispitan variranjem pH vrednosti između 5 i 9, sa korakom 1. Ovo je urađeno u cilju ispitivanja oblasti pH u kojoj odabrani bakterijski soj može da ispolji najvišu proteolitičku aktivnost. Eksperimentalna postavka je bila ista kao i za prethodne, pri čemu su sadržaj glutena i peptona zadržani na 10 g/l i 1 g/l, s obzirom da je variran po jedan parametar.

Najveća izmerena proteolitička aktivnost od 3,37 U/ml zabeležena je pri pH 7, dok je sledeća po opadajućem nizu vrednosti 2,99 U/ml pri pH 5. Najviša specifična aktivnost od 1,31 U/mg zabeležena je takođe pri pH 7. Sve zabeležene vrednosti su bile više od svih prethodno izmerenih. pH vrednosti fermentacione tečnosti od 5 i 7 imaju bolji uticaj na proizvodnju proteaza u poređenju sa višim pH vrednostima. Može se izvesti preliminarni zaključak da proizvedeni ekstracelularni enzimski preparat ima bolji pristup peptidnim frakcijama pri nižim pH vrednostima.

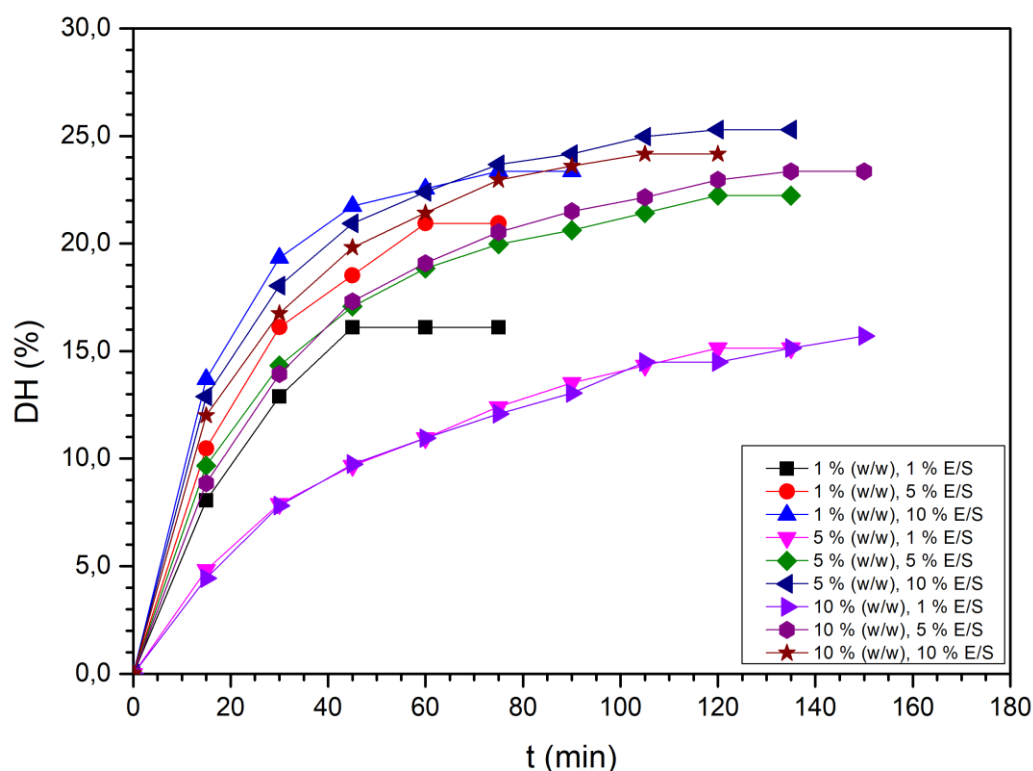
Shodno dobijenim rezultatima, u daljem toku rada korišćene su dve formulacije podloge: (a) jedna sa 10 g/l glutena i 0,25 g/l peptona i (b) druga sa samo 10 g/l glutena, pri čemu su svi ostali sastojci hranljive podloge zadržani pri istim prethodno korišćenim koncentracijama. U oba slučaja pH vrednosti su podešene na 6 i 7, i potom su zasejane sa bakterijskom kulturom starom 24 h i ostavljene 48 h na 37 °C. Cilj ove eksperimentalne postavke je bio potvrda prethodno dobijenih rezultata i zaključka da minimalno prisustvo peptona pozitivno utiče na proizvodnju ekstracelularnih proteaza. Takođe, podešavanjem pH vrednosti na 6 i 7 ispitan je pH optimum podloge za fermentaciju. Rezultati pokazuju da je prisustvo peptona u koncentraciji od 0,25 g/l pozitivno delovalo na proizvodnju proteaza. Aktivnost dobijene proteaze je bila veća kada je fermentacija izvedena pri pH 6 u poređenju sa pH 7. Zabeležena aktivnost proteaze pri pH 6 je 2,75 U/ml (10 g/l glutena) i 3,90 U/ml (10 g/l glutena i 0,25 g/l peptona). Specifična aktivnost za istu eksperimentalnu postavku je bila 1,31 U/mg (10 g/l glutena i 0,25 g/l peptona) pri pH 6. Zabeležena aktivnost je za 47,2% bila veća od formulacije bez peptona. Ovo implicira na činjenicu da zaista minimalno prisustvo peptona pozitivno utiče na proizvodnju proteolitičkih enzima. Takođe možemo zaključiti da ispitani bakterijski soj bolje proizvodi ekstracelularne proteaze u blago kiseloj pH sredini. Prema literaturnim podacima, dodatak peptona utiče na proizvodnju enzima na više načina, i to tako da se dodatkom veće količine peptona ne obezbeđuje uvek povećana enzimska aktivnost. Naime, dodatkom peptona u onim količinama koje su minimalno iznad osnovnih potreba mikroorganizma obezbeđuje se benefit. Rezultati dobijeni ovim eksperimentalnim radom su u saglasnosti sa literaturom (Dutta, Deb, & Majumdar, 2016; Chopra & Mathur, 1983). Takođe, literaturni podaci navode da se proteolitička aktivnost smanjuje pri višim koncentracijama izvora organskog azota, najverovatnije zbog represije sinteze enzima, odnosno pri višim koncentracijama izvora azota stimulirana je proizvodnja proteaza do određenih graničnih nivoa (Gomaa, 2013).

Daljim ispitivanjem specifičnih aktivnosti dobijenih enzima prema specifičnim supstratima, koji su jasan pokazatelj sposobnosti enzimskog preparata da raskida specifične veze sa aminokiselinom prolin, nisu dobijeni zadovoljavajući rezultati i zabeleženo je skoro potpuno odsustvo tražene enzimske aktivnosti. Stoga, proizvedeni enzimski preparat je isključen iz daljeg eksperimentalnog rada. Shodno negativnim rezultatima dalja istraživanja su bila usmerena ka ispitivanju mogućnosti upotrebe komercijalno dostupnih proteolitičkih enzima, endopeptidaza, s obzirom na to da je krajnji cilj ove doktorske disertacije pronalaženje i dizajn novog tehnološkog postupka kojim će biti omogućena redukcija prisustva alergeni epitopa, kako na model proteinu glutenu, tako i na komercijalno dostupnom pšeničnom brašnu.

9.2. Preliminarni eksperimenti – enzimaska hidroliza

9.2.1. Preliminarne hidrolize glutena

U preliminarnoj fazi istraživanja procesa enzimske hidrolize glutena iz pšenice ispitane su tri različite koncentracije supstrata i tri različite koncentracije enzima (Alkalaze). Koncentracija supstrata varirana je u interbalu 1–10%, a koncentracija enzima u istom intervalu 1–10%. Na osnovu izmerenih stepena hidrolize (Slika 9.2.1, DH, %) za dalji rad je odabrana koncentracija enzima od 5%, s obzirom da nema značajne razlike u stepenu hidrolize između uzoraka tretiranih sa 5 ili 10% enzima. Odabir radne koncentracije enzima od 5% je u ovom slučaju ekonomski opravdan. Enzim Alkalaza se pokazao kao efikasan, pri čemu i najmanje količine unetog enzima uspešno hidrolizuju gluten čak i pri većim koncentracijama (stepen hidrolize ~15%).



Slika 9.2.1. Preliminarne enzimske hidrolize glutena iz pšenice pomoću Alkalaze. Ispitane su tri različite koncentracije supstrata (1–10% (w/w)) i tri različita enzim-supstrat odnosa (E/S 1–10%). Reakcioni uslovi: 60 °C, pH 8, 200 o/min.

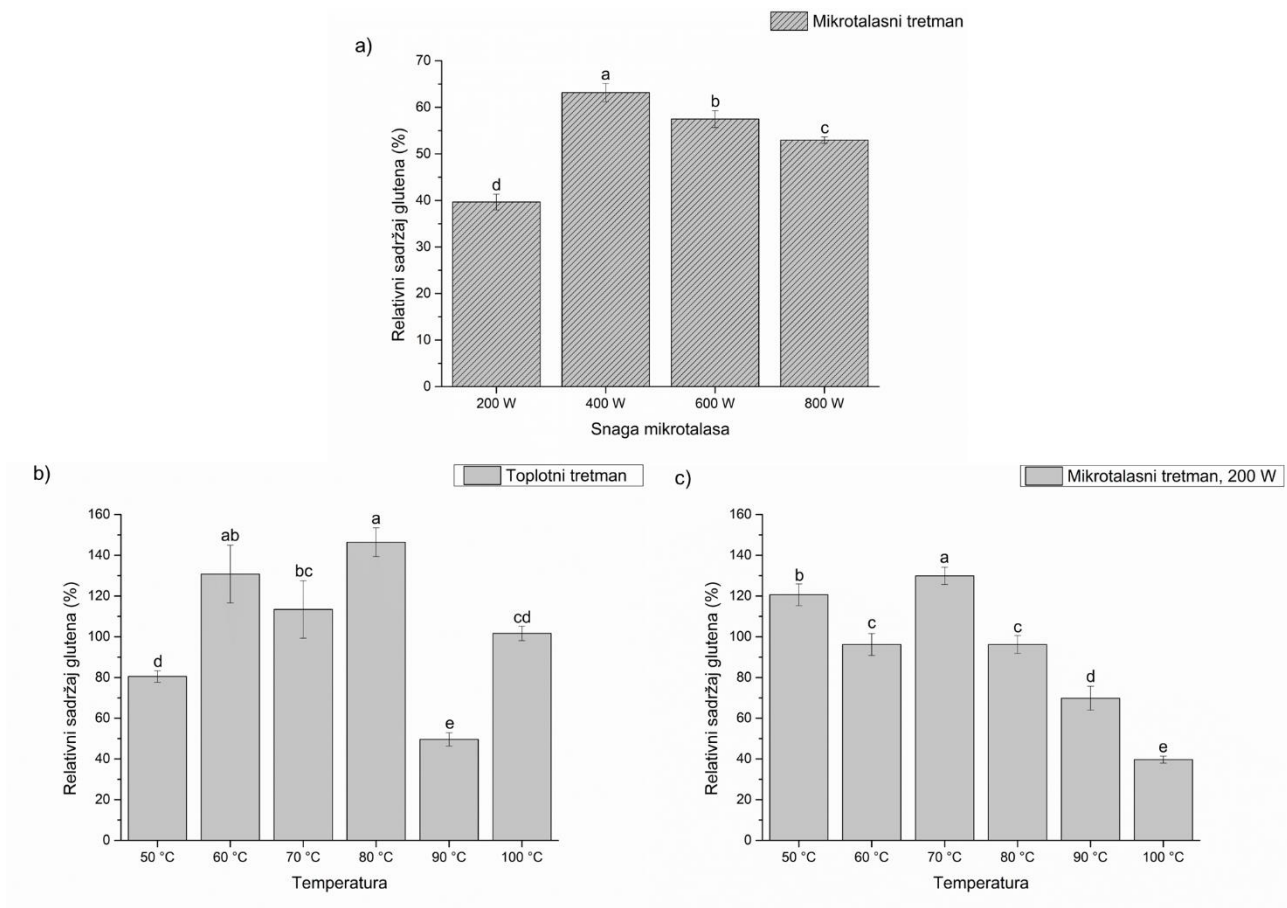
9.3. Mikrotalasni i toplotni tretman

9.3.1. Uticaj parametara tretmana na sadržaj alergeni epitopa glutena

Uticaj mikrotalasnog zračenja na nativni gluten ispitan je u mikrotalasnom reaktoru kao funkcija dva reakciona parametra, mikrotalasne snage i temperature, i rezultati su upoređeni sa konvencionalnim toplotnim tretmanom. Pšenični gluten u svom nativnom stanju sadrži nečistoće, kao što su ugljeni hidrati i proteini. Ovi sastojci su osetljivi na temperature veće od 90 °C, pri kojoj dolazi do denaturacije i degradacije prirodnih komponenti kao i sporednih reakcija poput Maillardove (Maillard) reakcije. Sve ovo navodi istraživače na integrisanje i razvoj novih alternativnih i manje agresivnih fizičkih tretmana (Woo, Kim, Hwang, Lee, & Jeong, 2015). Cilj istraživanja ove disertacije

je bio da se dobiju modifikovani proteini glutena u visokom prinosu sa smanjenom količinom toksičnih imunogenih epitopa, a sa ujedno očuvanim i unapređenim tehnološko-funkcionalnim svojstvima. Ovo nas upućuje na to da je potrebno obezbediti posebne uslove za izvođenje ovakve reakcije. Stoga u prvom koraku fokus je bio na ispitivanju mogućnosti primene mikrotalasnog tretmana na proteine glutena upotrebom mikrotalasnog reaktora sa preciznom kontrolom temperature u cilju modifikovanja proteina glutena na način kojim bi se uspešno uticalo na smanjenje njegove alergnosti. Uticaj mikrotalasnog zračenja različite snage u opsegu 200–800 W i temperatura 50–100 °C, pod kontrolisanim uslovima, na sadržaj alergnih epitopa glutena izražen kao relativni sadržaj glutena (%), prikazan je na **Slici 9.3.1**. Promene u fizičkom izgledu tretiranih uzoraka date su na **Slici 9.3.2**. Rezultati su pokazali da je primena mikrotalasnog tretmana na proteine glutena rezultovala u smanjenoj detekciji sadržaja glutena u svim tretiranim uzorcima glutena (**Slika 9.3.1a**) u poređenju sa netretiranim uzorkom polazne sirovine. Najveće smanjenje u detektovanom relativnom sadržaju glutena je zabeleženo za uzorke glutena tretirane sa 200 W mikrotalasne snage, pri čemu su ti uzorci zadržali $39,65 \pm 1,69\%$ svog početnog alergnog sadržaja. Prilikom primene niske snage mikrotalasa, primećeno je inicijalno smanjenje sadržaja alergnih epitopa. Primenom mikrotalasne snage od 400 W uzorci su zadržali $63,16 \pm 1,96\%$ svog inicijalnog alergnog sadržaja, nakon čega je daljim porastom primenjene snage mikrotalasa (600 W, 800 W) primećen opadajući trend alergnog sadržaja. Mehanizam delovanja mikrotalasnog zračenja i njegov uticaj na alergnost glutena na molekularskom nivou se pokazao kao veoma kompleksan i bazira se na izmenama u konformaciji epitopa, što je pokazano FTIR analizama (**Poglavlje 9.5, Slike 9.5.1 i 9.5.2**). Proces denaturacije i otvaranja molekula glutena je bio veći prilikom primene mikrotalasne snage od 400 W nego 200 W, čime su sakriveni epitopi glutena postali dostupniji antitelima koja se koriste u ELISA testu, a samim tim je zabeležena i veća alergna vrednost. Međutim, dalje povećanje primenjene snage mikrotalasa na čak 800 W kao rezultat može imati potpuno drugačiji efekat na strukturu glutena. Te promene uključuju povezivanje proteina gliadina i glutenina preko disulfidnih veza koje mogu dovesti do razaranja i/ili maskiranja nekih epitopa, ili mogu dovesti do dodatne denaturacije epitopa što rezultuje u smanjenoj alergnosti. Kao dodatno objašnjenje se može dati i to da agregacija i smanjenje rastvorljivosti, pre nego razaranja epitopa, dovode do opaženih smanjenja imunoreaktivnosti glutena pri većim snagama mikrotalasa. Stoga, buduća istraživanja imunoreaktivnosti različitih rastvornih i nerastvornih frakcija glutena moraće dodatno da se bave objašnjenjem mehanizama inaktivacije toksičnih epitopa glutena ([Mahroug, et al., 2019](#)). Studije bazirane na sličnom principu su pokazale da primenom manje doze mikrotalasne energije, imunoreaktivnost gliadinske frakcije raste, dok je primenom jačih doza mikrotalasne energije (500W, 2 min) zabeleženo smanjenje vrednosti imunog odgovora na gliadin ([Leszczynska, Łacka, Szemraj, Lukamowicz, & Zegota, 2003](#)). Na osnovu dobijenih rezultata, za dalji rad je odabrana mikrotalasna snaga od 200 W kako bi se detaljnije ispitaio efekat temperature na količinu detektovanog sadržaja glutena.

Da bi se uporedio efekat mikrotalasnog tretmana u odnosu na konvencionalni toplotni tretman, uzorci glutena su zagrevani do 50–100 °C, sa korakom od 10 °C. Iste temperature su podešene na mikrotalasnom reaktoru i primenjena je snaga od 200 W. Rezultati (prikazani na **Slika 9.3.1b,c**) su pokazali da uzorci glutena koji su tretirani mikrotalasnom snagom od 200 W ispoljavaju donekle opadajući trend u relativnom sadržaju glutena za odabrane temperature. Najniže vrednosti relativnog sadržaja glutena od $49,56 \pm 3,25\%$ i $39,65 \pm 1,69\%$ zabeležene su za konvencionalni toplotni tretman na 90 °C i za mikrotalasni tretman (200 W, 100 °C), respektivno. Ovi rezultati ukazuju na to da je na detekciju glutena u velikoj meri uticao mikrotalasni tretman. Naime, približno smanjenje u detektovanoj količini glutena od 2,5 puta je postignuto primenom 200 W mikrotalasne snage. S obzirom na to da su mikrotalasni tretman i konvencionalno zagrevanje, pri istim temperaturama, različito uticali na sadržaj glutena, može se zaključiti da su mikrotalasni efekti (netermalni) izvršili uticaj na promenu strukture glutena i na alergnost glutena. Stoga, može se istaći da mikrotalasni tretman u kontrolisanim uslovima dovodi do strukturnih promena, što se ogleda u razaranju mreže vodoničnih veza koje za posledicu imaju rotaciju dipola molekula proteina glutena i migraciju jona ka tečnoj fazi ([Lamacchia, Landriscina, & D'Agello, 2016](#)).



Slika 9.3.1. Relativni sadržaj glutena (%) nakon a) mikrotalasnog pretretmana pšeničnog glutena pri različitim snagama mikrotalasa (200–800 W); b) toplotno tretiranog pšeničnog glutena na različitim temperaturama (50–100 °C); c) mikrotalasno tretiranog glutena pri snazi od 200 W na različitim temperaturama (50–100 °C). Svi uzorci su poređeni sa netretiranim uzorkom glutena, koji se smatrao kontrolnim uzorkom (100%). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ($n=2$). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima na istoj slici su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

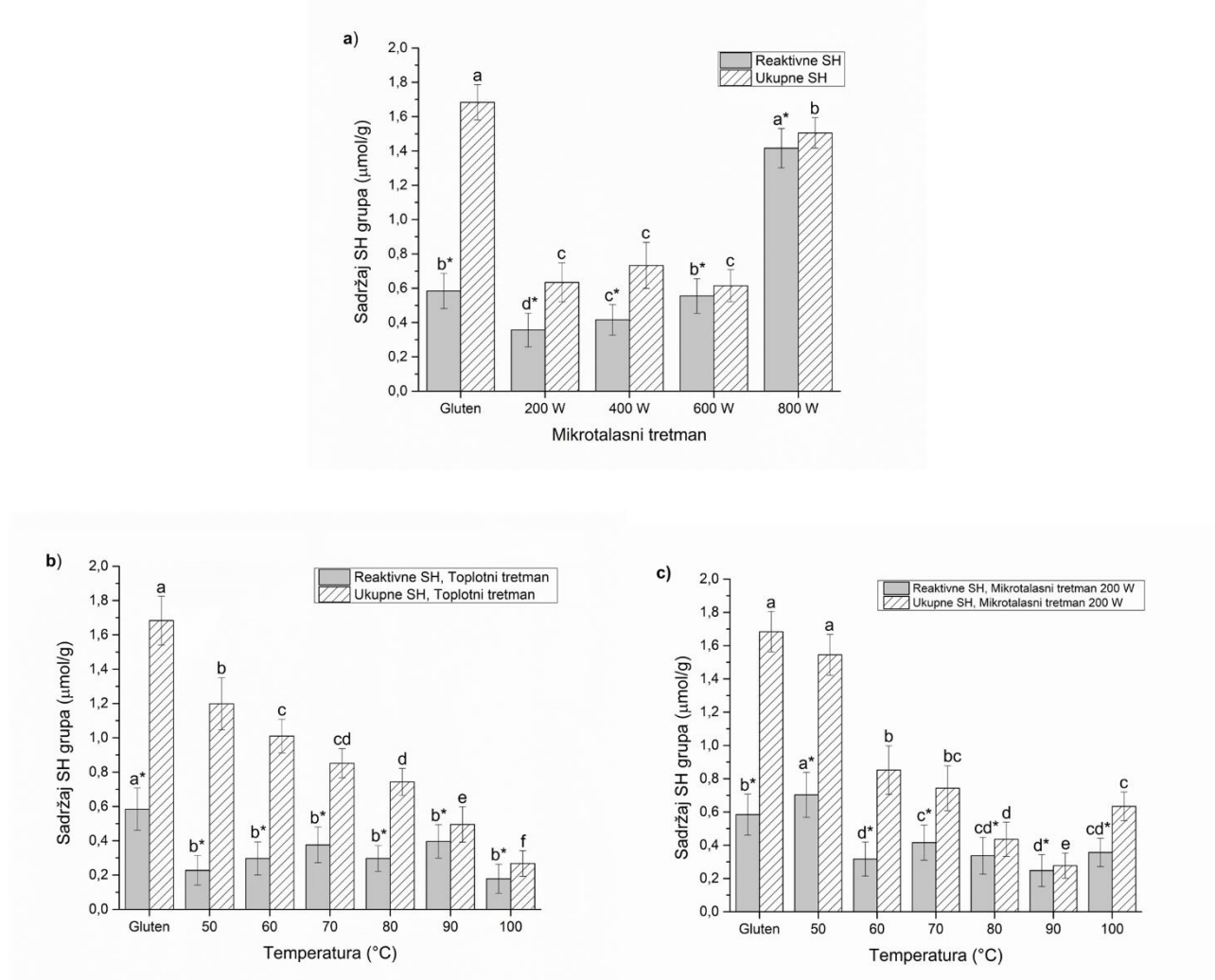


Slika 9.3.2. Uzorci glutena nakon mikrotalasnog tretmana (200–800 W).

U poređenju sa toplotnim tretmanom, primena mikrotalasne energije predstavlja obećavajuću alternativu s obzirom na značajno smanjenje vremena neophodnog da se obavi tretman. Ovime se poboljšava ekonomičnost procesa i smanjuje vreme izlaganja proteina glutena visokim temperaturama, što ujedno utiče na njihove karakteristike. Vreme neophodno za izvođenje mikrotalasnog tretmana (200W, 50–100 °C) kretalo se od svega nekoliko sekundi do 1 min, dok je za konvencionalni toplotni tretman bilo potrebno između 2,5 i 25 min (50–100 °C). Dalje, primena toplotnog tretmana je nepoželjna iz više poznatih razloga, a jedan od njih je negativan uticaj temperature na nutritivna i funkcionalna svojstva proteina usled stvaranja disulfidnih veza između polipeptidnih lanaca mehanizmom acilovanja slobodnih amino grupa (Cheftel, 1977). Aminokiselina lizin je jedna od aminokiselina koja je najpodložnija ovom tipu reakcije, ali takođe i aminokiseline serin, cistein i cistin kao i triptofan daju proizvode reakcije koji značajno redukuju nutritivnu vrednost proteina. Ovaj proces obuhvata primenu visokog pritiska, sile kao i visokih temperatura tokom dugog vremenskog perioda koji za posledicu imaju nepovratnu denaturaciju proteina glutena prouzrokovanu deamidacijom aspartamske kiseline i ostataka glicina, razaranje peptidne veze aspartamske kiseline i uništavanje aminokiselinskih ostataka (Wang & Damodaran, 1990). Lamakija (Lamacchia) i saradnici su u svom istraživanju pokazali da gliadini iz mikrotalasno pretretiranog brašna (uslovi u mikrotalasnoj pećnici: 1000 W, 2 min dužina trajanja tretmana kako bi se postigla temperatura 110–120 °C) ispoljavaju smanjenu reaktivnost sa R5 antitelom. Međutim, iako su postignute modifikacije sekundarne strukture koje se odnose na disagregaciju polimerne strukture sa mikrotalasnim tretmanom, primećeno je da mikrotalasni tretman nije dovoljan kao pretretman da u potpunosti detoksifikuje gluten tako da bude bezbedan za osobe koje pate od celijačne bolesti (Mahroug, et al., 2019). Pregledom dostupne literature može se istaći da postoji veliki broj studija koje se bave uticajem mikrotalasnog zračenja na toksičnost glutena u slučaju osoba obolelih od celijačne bolesti, sa oprečnim rezultatima kao i naučnim dokazima koji upućuju na neefikasnost ovog pristupa (Mahroug, et al., 2019; Gianfrani, et al., 2017). S tim u vezi, naučne studije su pokazale da mikrotalasni tretman natopljenih zrna pšenice rezultuje u smanjenom sadržaju toksičnih epitopa glutena ispitivanih sa R5-ELISA testom i nakon deamidacije, ispitano u *in vitro* studijama na T ćelijama izolovanim iz creva pacijenata obolelih od celijačne bolesti (Wang & Damodaran, 1990; Lamacchia, Di Luccia, & Gianfrani, 2013). Međutim, druge studije su prijavile da mikrotalasni tretman nema uticaja ni na hemijsku modifikaciju glutena kao ni na samo razaranje glutena (Mahroug, et al., 2019; Gianfrani, et al., 2017). U publikaciji Đanfranija (Gianfrani) i saradnika (Gianfrani, et al., 2017), primenom LC-MS/MS i *in vitro* ispitivanjima sa T ćelijama pacijenata obolelih od celijaklije, mikrotalasni tretman nije imao uticaja na toksičnost glutena, iako su prvi rezultati pokazivali smanjenje u imunoreaktivnosti sa R5 monoklonskim antitelom ispitnog nesvarenog mikrotalasno tretiranog glutena. Potvrđeno je da mikrotalasni tretman utiče na rastvorljivost proteina pšeničnog zrna i da uzrokuje smanjenje u sadržaju glutena, do 70 ppm, što je u skladu sa rezultatima drugog istraživanja (Wang & Damodaran, 1990). Međutim, ustanovljeno je da imunoreaktivne R5 komponente gliadina mikrotalasno tretiranog zrna nisu ekstrahovane, i samim tim verovatno zaostaju zakačene za supstrat usled denaturacije. S obzirom na dostupne literaturne podatke može se zaključiti da oprečni rezultati mogu biti posledica primene različitih metoda ekstrakcije i analitičkih metoda detekcije, kao i različitih mikrotalasnih uređaja. Mikrotalasni uređaji i sistemi korišćeni u eksperimentalnim postavkama uglavnom nisu detaljno opisani, a nedostaci se uglavnom ogledaju u izostavljenim podacima o postignutim temperaturama i kontroli zračenja. Naime, da bismo uspešno ponovili iste uslove koji se tiču temperature i primenjene energije, kontrola vremena i snage su od velike važnosti u ovom procesu. Pošto su u literaturi uglavnom korišćene mikrotalasne pećnice za kućnu namenu, postavlja se pitanje koliku kontrolu nad procesom imaju istraživači, i da li će slične mikrotalasne pećnice dati makar približno iste rezultate. Još jedan nedostatak mikrotalasnih tretmana i objavljenih istraživanja ogleda se u odsustvu mešanja uzorka, što nas dovodi do pitanja kako obezbediti ravnomerno mešanje tečne suspenzije u cilju ravnomernog zagrevanja i postizanja željenog temperaturnog profila. Rezultati prikazani u ovom poglavlju doktorske disertacije su potvrdili potencijal mikrotalasnog tretmana za smanjenje alergenosti glutena, ali ostaje pitanje njegove dalje efikasnosti u *in vivo* uslovima, u gastrointestinalnom traktu. Stoga, cilj ovog dela

istraživanja je bio da se pronade način kako prevazići prepreke i nedostatke prethodno primenjenih mikrotalasnih tretmana. U daljem istraživanju u okviru ove doktorske disertacije biće primenjena kombinacija mikrotalasnog tretmana i enzimske hidrolize, u cilju detoksifikacije glutena, ali i proizvodnje kvalitetnih hidrolizata sa dobrim tehno-funkcionalnim svojstvima.

U cilju boljeg razumevanja prethodno objašnjenih rezultata i uticaja mikrotalasnog pretretmana na promene u strukturi proteina glutena, vršena su merenja sadržaja ukupnih i reaktivnih sulfhidrilnih (SH) grupa. Rezultati mikrotalasnog pretretmana su poređeni sa onima dobijenim konvencionalnim zagrevanjem. Ovi rezultati prikazani su na **Slici 9.3.3**.



Slika 9.3.3. Sadržaj ukupnih i reaktivnih SH grupa izmerenih nakon: a) mikrotalasnog tretmana pšeničnog glutena primenom različitih snaga mikrotalasa (200–800 W); b) toplotnog tretmana pšeničnog glutena na različitim temperaturama (50–100 °C); c) mikrotalasno tretiranog pšeničnog glutena pri snazi od 200 W na različitim temperaturama (50–100 °C). Svi uzorci su mereni pri istom sadržaju proteina, 2 mg/ml. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima na istoj slici su statistički značajno različite (p < 0,05).

Analizom dobijenih rezultata primećena je velika zavisnost sadržaja i ukupnih i reaktivnih SH grupa od primenjene snage mikrotalasa i temperature, ali takođe i samog tretmana. U pogledu sadržaja SH grupa prikazanih na **Slici 9.3.3a**, mikrotalasni tretman proteina glutena rezultovao je u statistički značajnom (p < 0,05) porastu vrednosti sadržaja reaktivnih SH grupa pri primenjenoj snazi mikrotalasa od 800 W. Tretman ovom snagom pokazao se boljim u odnosu na tretmane sa primenjenom manjom snagom. Kontrolni uzorak glutena je pokazao značajne razlike između količine ukupnih i reaktivnih SH grupa, 1,68 ± 0,103 i 0,58 ± 0,103 μmol/g, respektivno. Porast u sadržaju

ukupnih i reaktivnih SH grupa primenom snage od 800 W se može objasniti promenama indukovanim toplotnim efektima, koji mogu dovesti do parcijalnog odmotavanja polipeptidnih lanaca. Kao posledica dejstva ovih toplotnih efekata sakrivene SH grupe ($SH_{\text{reaktivne}}=0,36-1,40 \mu\text{mol/g}$ i $SH_{\text{ukupne}}=0,63-1,50 \mu\text{mol/g}$) dolaze do izražaja, tačnije bivaju izložene. Naime, tokom mikrotalasnog tretmana, veći deo SH ostataka u glutenu koji se nalazio sakriven u unutrašnjosti molekula proteina postaju izloženi tokom kontrolisane toplotne denaturacije. Kako je podložnost glutena enzimskoj hidrolizi nakon mikrotalasnog tretmana od 600 W bila veoma visoka ($DH \sim 32\%$), smanjenje ukupnog sadržaja SH grupa se može objasniti formiranjem uglavnom intramolekulskih disulfidnih veza usled sulfhidrilne oksidacije. Nasuprot tome, povećanje ukupnog sadržaja SH grupa može doprineti razaranju intramolekulskih disulfidnih veza indukovanih temperaturama višim od $100 \text{ }^\circ\text{C}$ primenom tretmana sa mikrotalasnom snagom većom od 600 W. Osim toga, smanjenje podložnosti proteinskog supstrata hidrolizi i povećanje u inhibiciji supstrata može se dovesti u vezu sa prisustvom intermolekulskih disulfidnih veza, čime se obezbeđuje formiranje agregata proteina. Pretpostavka o formiranju agregata proteina je u saglasnosti sa merenjima količine detektovanog relativnog sadržaja glutena (**Slika 9.3.1a,c**). Primenom konvencionalnog toplotnog tretmana (**Slika 9.3.3b**) zabeležene su niske vrednosti značajnih razlika ($p < 0,05$) među sadržajima reaktivnih SH grupa zagrevanih uzoraka glutena i kontrolnog uzorka. Osim toga, sadržaj ukupnih SH grupa je opao nakon toplotnih tretmana u opsegu temperatura od 50 do $100 \text{ }^\circ\text{C}$, sa $1,2$ na $0,3 \mu\text{mol/g}$, respektivno ($p < 0,05$). Mikrotalasni tretman proteina glutena snagom 200 W na $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (**Slika 1c**) čini se da je doveo do povećanja u sadržaju reaktivnih SH grupa usled odmotavanja proteina uz prateću pojavu agregacije, čime je smanjen ukupni sadržaj SH grupa, i verovatno porast broja disulfidnih veza. Tokom eksperimentalnog rada snaga mikrotalasnog tretmana je bila podešena na 200 W , pri čemu se vremena tretmana razlikuju u zavisnosti od željene temperature koju želimo da postignemo. Može se istaći da duža vremena izlaganja dovode do viših temperatura ($100 \text{ }^\circ\text{C}$), pri čemu se formiraju agregati proteina glutena, na primer, molekuli gliadina polimerizuju i umrežavaju se sa gluteninima. U isto vreme se dešava oksidacija slobodnih SH grupa, formiraju se S-S veze i kao posledica toga je očigledna pojava umrežavanja agregata gliadina sa glutetninima. Mikrotalasni tretman je očigledno imao jači uticaj u opsegu temperatura od 60 do $90 \text{ }^\circ\text{C}$ na sadržaj i ukupnih i reaktivnih SH grupa, u poređenju sa toplotnim tretmanom prvenstveno na $90 \text{ }^\circ\text{C}$. Ovo ukazuje na različiti mehanizam delovanja toplotnog i mikrotalasnog tretmana na denaturaciju proteina glutena.

Očigledan je uticaj primenjene snage mikrotalasa i temperatura na promene u molekulima proteina koje se mogu dovesti u vezu sa razmotavanjem proteina glutena i agregacijom. Ove pretpostavke su u skladu sa dostupnim literaturnim podacima, koji se tiču analize efekata toplotnog tretmana na strukturu glutena ([Mahroug, et al., 2019](#); [Wang & Damodaran, 1990](#)). Potrebno je istaći da u trenutno dostupnoj naučnoj literaturi ne postoje podaci o upotrebi mikrotalasnog reaktora i njegovog uticaja na gluten. Time podaci dobijeni u ovom istraživanju daju značajan doprinos ovoj oblasti istraživanja i nude jedinstvenu osnovu za dalja ispitivanja. Sa teorijskog stanovišta, glavna uloga SH grupa ogleda se u određivanju i stabilizaciji trodimenzionalne strukture proteina, stoga promene u sadržaju SH grupa prouzrokovane zagrevanjem predstavljaju prvi pokazatelj da su se odigrale neke od fundamentalnih promena u strukturi proteina glutena. Poznato je da subjedinice glutena formiraju uređene fibrilarne polimerne makromolekule sa intermolekulskim disulfidnim vezama, dok gliadini formiraju samo intramolekulske disulfidne veze ([Ma, Han, Li, Zheng, & Wang, 2019](#)). Na osnovu iznetih podataka, možemo zaključiti da se uticaj mikrotalasno-kontrolisanog toplotnog tretmana ogleda u odmotavanju nativne konformacije proteina čineći lance proteina glutena dosuptnije, tj. smanjenju broja S-S veza koje su odgovorne za održavanje strukture agregata proteina.

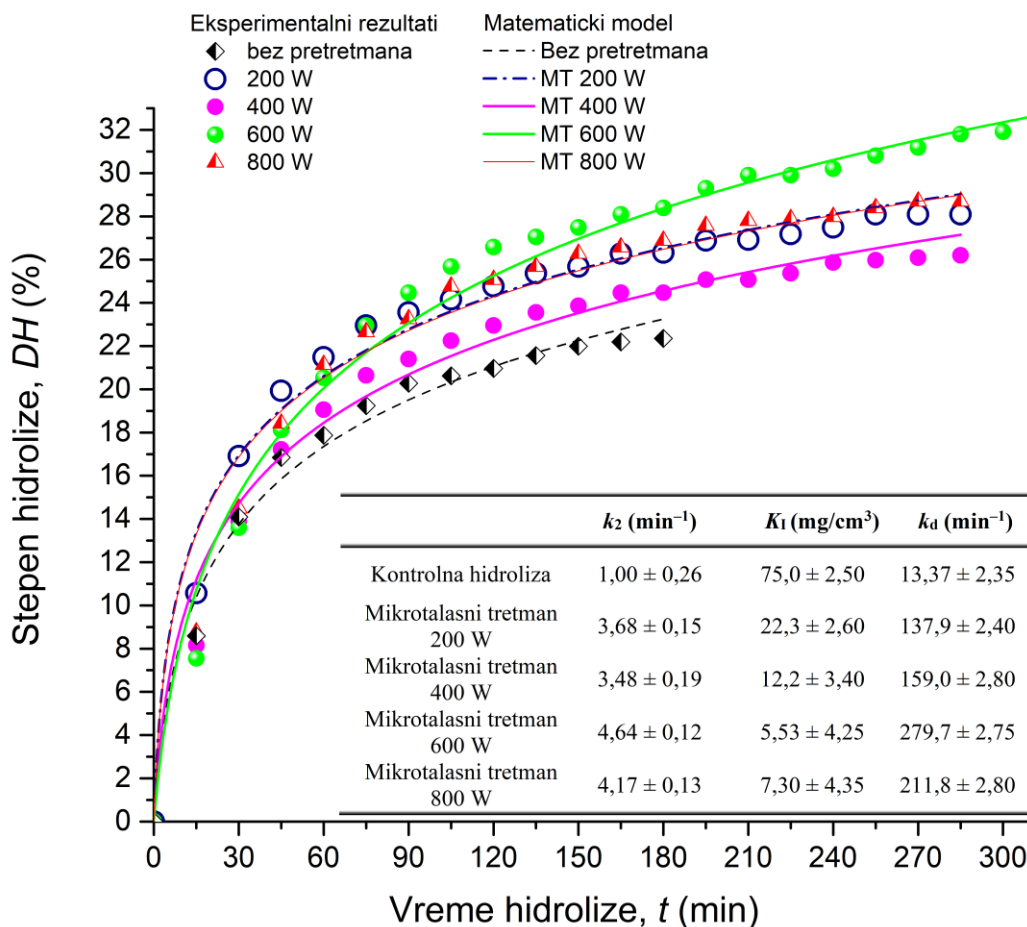
9.4. Enzimski hidroliza i njen uticaj na smanjenje alergeniog sadržaja glutena

9.4.1. Mikrotalasni tretman kao pretretman za enzimsku hidrolizu

Nakon serije tretmana mikrotalasima eksperimentalni rad nastavljen je u pravcu primene biokatalizatora u cilju dodatnog smanjenja sadržaja alergeni epitopa. Ovime je ispitan kombinovani efekat mikrotalasnog tretmana i komercijalnog enzima Alkalaze na sadržaj alergeni epitopa glutena u dobijenim hidrolizatima. Polazna osnova za ova ispitivanja jeste prethodno dobijeni rezultat koji se odnosi na uticaj mikrotalasa na smanjenje detektovane alergeniosti, a uz to visok sadržaj prolina u glutenu koji dodatno otežava postupak kompletne enzimске hidrolize. Kako bismo ispitali ovaj kombinovani uticaj mikrotalasnog pretretmana i biokatalizatora na detektovani sadržaj glutena, varirane su primenjene snage mikrotalasa od 200, 400, 600 i 800 W. Ovaj korak pretretmana je potom ispraćen enzimskom hidrolizom sa Alkalazom (**Slika 9.4.1**) i cilj ovakve eksperimentalne postavke je bio da se ispita da li mikrotalasni pretretman olakšava postupak hidrolize toksičnih epitopa. Upotrebom mikrotalasnog reaktorskog sistema Anton Paar Monowave 300 bilo je moguće u potpunosti kontrolisati postupak pretretmana u vidu: temperature, vremena tretmana i snage, što je od velike važnosti kada je u pitanju tretman proteinskog uzorka gde sam proces može imati direktan uticaj na finalne karakteristike krajnjeg proteinskog proizvoda. Na **Slici 9.4.1** se vidi da je mikrotalasni pretretman značajno promenio profil procesa hidrolize ($p < 0,05$) primenom svih mikrotalasnih snaga (200–800W) u odnosu na kontrolni uzorak bez pretretmana. Početne brzine ovih enzimskih reakcija su se povećavale sa povećanjem primenjene snage mikrotalasnog pretretmana, dok je stepen hidrolize pratio uzlazni trend sa povećanjem snage mikrotalasa do 600 W, a potom je uočen pad prilikom primene snage od 800 W. Postignuti stepeni hidrolize (DH) kreću se u opsegu 20–32% tokom vremenskog perioda od 300 min. Tokom prvih 45 min enzimске hidrolize primećena je velika brzina reakcije gde su zabeleženi stepeni hidrolize od oko približno 16% i veći od 17% za kontrolnu enzimsku hidrolizu i za mikrotalasno pretretirane uzorke, respektivno. Nakon ovog perioda enzimski hidroliza usporava narednih 150–200 min, a potom ulazi u stacionarno stanje. Ovim je potvrđeno da mikrotalasno pretretirani proteini glutena imaju veću podložnost enzim Alkalazi, tačnije supstrat postaje dostupniji. Ovako pripremljeni hidrolizati su dalje ispitani na sadržaj alergeni epitopa. Profil enzimске hidrolize dobijen u ovom eksperimentalnom radu sličan je profilima enzimskih hidroliza dobijenih radom Elmalimadija (Elmalimadi) i sar. (2017) i Konga (Kong) i sar. (2007) (Elmalimadi, et al., 2017a; Kong, Zhou, & Qian, 2007). Očigledan inicijalan porast u podložnosti glutena enzimskoj hidrolizi može se pripisati promenama u konformaciji u molekulima glutena indukovanim mikrotalasnim pretretmanom. Ovaj vid pretretmana može izazvati parcijalno ili potpuno razmotavanje polipeptida i time dovesti do izlaganja prethodno sakrivenih peptidnih veza, čineći ih dostupnijim enzim. Međutim, pretretman mikrotalasnog snagom od 800 W je doveo do značajnog pada ($p < 0,05$) u podložnosti glutena enzimskoj hidrolizi u poređenju sa pretretmanom sa 200 W, ukazujući na mogućnost da je došlo do prethodno opisane agregacije proteina glutena kojom je postignuta zaštita unutrašnjih veza proteina.

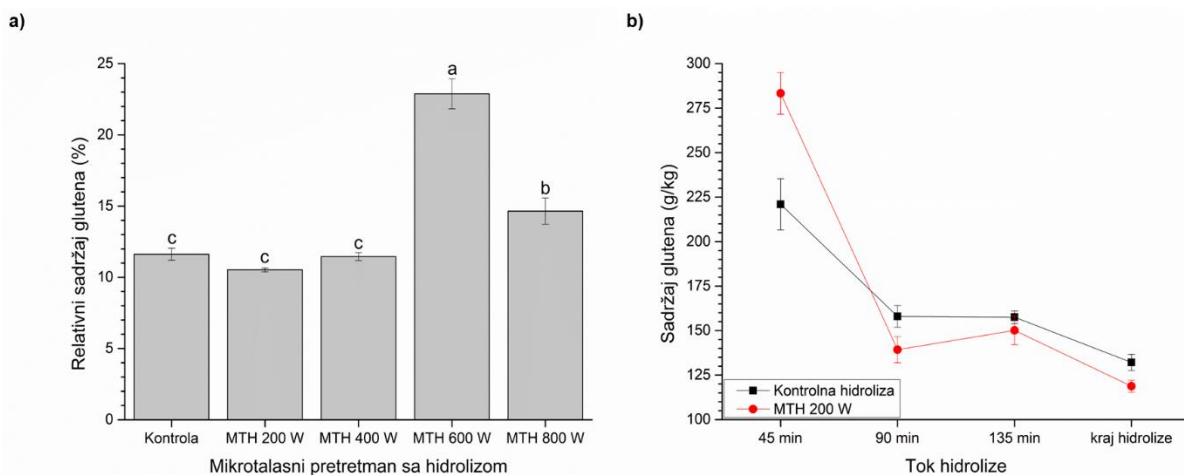
U cilju kvantitativne komparacije efekata mikrotalasnog pretretmana, eksperimentalni podaci su fitovani polu-empirijskim modelom koji uzima u obzir inaktivaciju enzima i inhibiciju supstratom i određene su vrednosti kinetičkih konstanti. Pretpostavljeni matematički kinetički model koji reakciju hidrolize razmatra kao reakciju nultog reda, odnosno kao reakciju kod koje brzina ne zavisi od koncentracije proteina (peptidnih veza), bio je u dobroj korelaciji sa dobijenim eksperimentalnim rezultatima ($R^2 \geq 0,98$). Na osnovu proračunatih vrednosti za konstantu brzine reakcije (k_2), mikrotalasni pretretman je unapredio brzinu reakcije enzimске hidrolize glutena u poređenju sa kontrolnom hidrolizom (umetnuta tabela na **Slici 9.4.1**). Za mikrotalasni pretretman od 200 W, zabeleženo je povećanje brzine reakcije od 3,6 puta, dok je postignuti stepen hidrolize proteina glutena (DH) povećan za samo 3%. Međutim, za mikrotalasni pretretman sa jačom snagom, 600 W, zabeleženo je povećanje brzine reakcije za 4,6 puta, kao i značajan porast u stepenu hidrolize, čak 9 %. Konstante inaktivacije i brzine deaktivacije reakcije su značajno varirale u vrednostima u zavisnosti od primenjene snage mikrotalasa, i to u opsegu 5,53–22,3 mg/cm³ i 137,9–211,8 min⁻¹,

respektivno. Moguće je da je mikrotalasni pretretman doveo do strukturnih promena unutar molekula glutena tako da su postali dostupniji enzimu Alkalazi, ali da je ujedno smanjeno vezivanje supstrata za enzim koje može uticati na konstante inhibicije (K_i) i enzimsku stabilnost (k_d).



Slika 9.4.1. Poređenje učinkovitosti različitih mikrotalasnih pretretmana na proteine glutena i podložnosti tako tretiranih uzoraka enzimskoj hidrolizi komercijalnom enzimskom proteazom, Alkalazom. Eksperimentalni rezultati fitovani su kinetičkim modelom nultog reda koji pretpostavlja inhibiciju supstrata i inaktivaciju enzima. Reakcioni usovi za postupak hidrolize predstavljenih krivih su: koncentracija glutena 2% (w/w), E/S odnos 5%, temperatura reakcije 60 °C i pH 8,0. Umetnuta tabela – vrednosti kinetičkih konstanti za enzimsku hidrolizu mikrotalasno pretretiranog glutena.

Primena snaga mikrotalasa od 600 i 800 W nije rezultovala u značajnom smanjenju sadržaja alergeni epitopa ($p > 0,05$, Slika 9.4.2a). Međutim, relativan sadržaj glutena u kontrolnoj hidrolizi i mikrotalasno pretretiranim hidrolizatima sa 200 i 400 W je značajno smanjen u poređenju sa netretiranim glutenom. Izmereno je smanjenje od približno 10 puta u sadržaju glutena. Pretretman mikrotalasa snage 200 W se pokazao kao najefikasniji u pogledu smanjenja sadržaja gluena, stoga je detaljnije ispitana ova hidroliza i upoređena sa kontrolnom hidrolizom (Slika 9.4.2b). Kako bismo ispitali da li je potrebno izvršiti kompletnu enzimsku hidrolizu kako bismo postigli najveće smanjenje sadržaja glutena, uzorci su uzimani tokom različitih vremena trajanja hidrolize, liofilizovani i određen im je sadržaj glutena. Očigledno je bilo da je pretretman sa snagom od 200 W u blagoj meri doprineo smanjenju sadržaja proteina glutena u dobijenom hidrolizatu u poređenju sa kontrolnom hidrolizom. Najveći doprinos pretretmana zabeležen je nakon 90 min hidrolize, kada je sadržaj glutena smanjen za 11,98% više od kontrolnog. Zaključak je da duže vreme izlaganja od 90 min ne doprinosi značajno smanjenju daljeg sadržaja alergeni epitopa glutena.



Slika 9.4.2. a) Relativni sadržaj glutena (%) kontrolnog hidrolizata glutena i mikrotalasno pretretiranih hidrolizata glutena (MTH) (200–800 W) (Alkalaza, pH 8,0, 60 °C) u poređenju sa netretiranim glutenom (100%) i b) profil smanjenja sadržaja glutena (g/kg) tokom enzimske hidrolize, kontrolna i MTH 200 W. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ($n=2$). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima na istoj slici su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

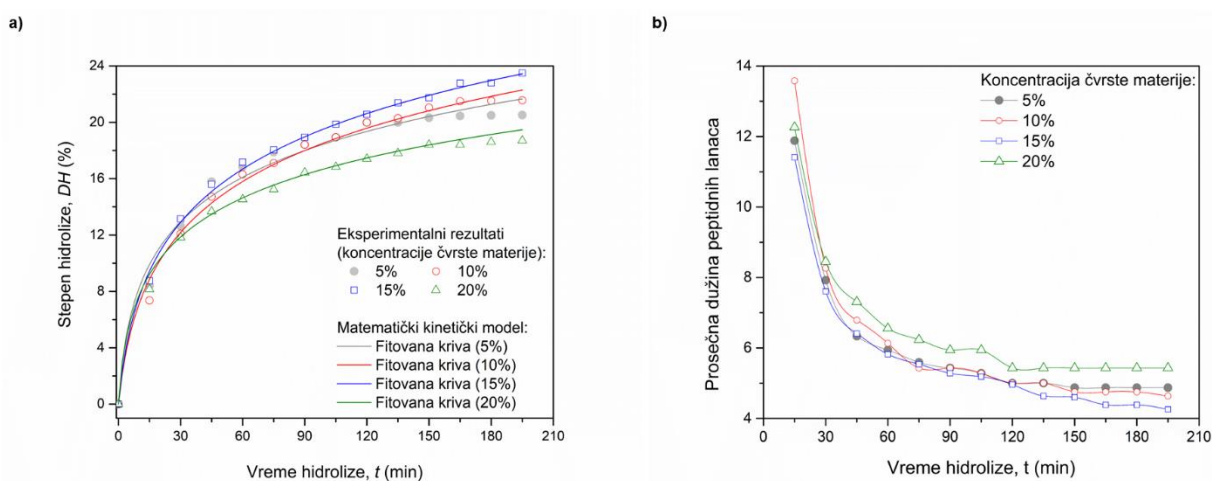
9.4.2. Uticaj prisustva ugljenih hidrata na tok enzimske hidrolize glutena

Druga faza istraživanja u okviru ove disertacije podrazumevala je primenu komercijalno dostupnih supstrata, koji se obilato primenjuju u prehrambenoj industriji, kao što je pšenično brašno. Cilj je bio ispitati ponašanje i uticaj enzimske hidrolize na sadržaj toksičnih epitopa glutena na ovom realnom supstratu. Komercijalno pšenično brašno koje je korišćeno u sebi sadrži oko 9% proteina, dok ostatak čine ugljeni hidrati, naročito skrob, masti, pepeo. S obzirom na sastav brašna, kao poseban izazov ističe se uticaj polisaharidnih komponenti, s obzirom da su prisutne u najvećem procentu, na tok enzimske hidrolize proteina. Enzimska hidroliza nativnog glutena proteazama pri blagim uslovima, je dovela do povećanja rastvorljivosti ovih proteina pri neutralnim pH vrednostima (Elmalimadi, et al., 2017a). Takođe, i druga funkcionalna svojstva ovih proteina su izmenjena, kao što su penjenje i mogućnost formiranja stabilnih emulzija. Istraživanje koje se odnosi na uticaj prisustva većeg sadržaja ugljenih hidrata na tok hidrolize i rezultati tih eksperimenata biće dati u daljem tekstu.

Pšenično brašno, sirovo, je podvrgnuto procesu enzimske hidrolize na 60 °C sa enzimom Alkalazom, pri čemu je odnos enzima i supstrata, tačnije enzima i proteina/glutena zadržan na 5% pri svim uslovima. Koncentracija supstrata je varirana. Eksperimentalni rezultati koji se odnose na profil i stepen enzimske hidrolize proteina sirovog pšeničnog brašna u funkciji vremena reakcije, fitovani su prethodno opisanim matematičkim kinetičkim modelom (Jovanović, et al., 2016a).

Postignuti stepeni hidrolize (Slika 9.4.3a) za 5, 10 15 i 20% (w/w) suspenziju sirovog pšeničnog brašna su $20,51 \pm 0,37\%$, $21,57 \pm 0,32\%$, $23,49 \pm 0,64\%$ i $18,41 \pm 0,73\%$, respektivno. Na osnovu ovih podataka možemo zaključiti da je pšenično brašno, bez uklanjanja skrobnih materija i masti, podložno enzimskoj hidrolizi enzimom Alkalazom. Povećanjem koncentracije supstrata u sistemu postignuti su viši stepeni hidrolize, sve do onog momenta kada je viskoznost sistema postala prevelika. Drugim rečima, najveći stepen hidrolize postignut je pri koncentraciji supstrata od 15% (w/w). Važno je istaći da je smanjenjem sadržaja dostupne vode u sistemu efekat hidrolize unapređen. Ovo znači da sa stanovišta potencijalne industrijske izvodljivosti, koncentrovani sistem, tačnije suspenzija, bi mogla biti korišćena u cilju proizvodnje hidrolizata smanjene alergnosti i unapređenih tehnološko-funkcionalnih svojstava. Enzimska hidroliza sirovog pšeničnog glutena Alkalazom, pri istom sadržaju proteina (1,5% (w/w)), dostigla je $22,34 \pm 0,49\%$. Ovo upućuje na to da je hidroliza proteina sirovog brašna izvođena pri 15% sadržaja suve materije, dok je u slučaju sirovog glutena to

iznosilo svega 2%. S druge strane, hidrolizom proteina sirovog pšeničnog brašna postignuta je statistički ekvivalentna vrednost stepena hidrolize onom koji je postignut prilikom hidrolize sirovog glutena (model proteina) tokom svih vremena reakcije (0–195 min). Razlike u stepenima hidrolize između uzoraka različitih sadržaja suve materije, postale su očigledne nakon 60 min. Hart i saradnici (Hardt, Boom, & van der Goot, 2015) su u svojim istraživanjima došli do istih zaključaka, pri čemu je eksperimentalna postavka podrazumevala sadržaj suve materije od 40%, što je 2,5 puta veći sadržaj nego u eksperimentima u ovoj disertaciji, dok je stepen hidrolize bio veći za 5% upotrebom poznatog enzima Flevorzima (Flavourzyme®), endo- i egzopeptidaze. Razlike u rezultatima mogu se pripisati različitim tipovima brašna korišćenih u eksperimentalnom radu. Naime, Ibis pšenično brašno koje su koristili Hart i saradnici sadržalo je $12,6 \pm 0,4\%$ proteina, 3% proteina više od brašna korišćenog za potrebe ove disertacije. Suspenzija brašna od 20% (w/w) je nakon postupka hidrolize rezultovala u veoma viskoznom hidrolizatu iz kog nije bilo moguće izdvojiti dovoljno supernatanta za bilo koju od daljih planiranih analiza, stoga je ovaj uzorak eliminisan iz daljeg rada. U daljem istraživanju pripremljena je nova 15% (w/w) suspenzija sirovog pšeničnog brašna koja je podvrgnuta enzimskoj hidrolizi Alkalazom, pri čemu su uzimani uzorci nakon 15, 30 i 45 min hidrolize kako bi se ispitaio uticaj dužine peptidnih lanaca na tehnološko-funkcionalna svojstva. Postignuti stepeni hidrolize nakon 15, 30 i 45 min su $8,50 \pm 0,53\%$, $13,09 \pm 0,72\%$ i $15,69 \pm 0,85\%$, respektivno. Može se zaključiti iz priloženih rezultata da tokom ovih vremena trajanja hidrolize Alkalaza uspešno zadržava svoju sposobnost da deluje na peptidne lance, uprkos visokoj koncentraciji suve materije. Generalno možemo pretpostaviti da skrobne granule ometaju agregaciju proteina glutena, čime olakšavaju postupak enzimske hidrolize, do 15% sadržaja suve materije u suspenziji, što odgovara približno 21 gramu ugljenih hidrata. Proizvedeni hidrolizati pšeničnog brašna su potom dalje analizirani u pogledu strukturnih, funkcionalnih, antioksidativnih i alergeni svojstava. Uzimajući u obzir da su pripremljeni hidrolizati zapravo smeše različitih polipeptidnih lanaca (di-, tri- i oligopeptida), možemo reći da je dužina peptidnog lanca u srazmeri sa srednjom molekulskom masom peptida u hidrolizatima. Stoga je analizirana srednja dužina peptidnih lanaca (APCL) i uočen je opadajući trend tokom procesa hidrolize (Slika 9.4.3b).



Slika 9.4.3. a) Profili i stepeni hidrolize (DH, %) pšeničnog brašna u funkciji vremena hidrolize i b) promena srednje dužine peptidnih lanaca (APCL) tokom hidrolize. Reakcioni uslovi hidrolize: enzim Alkalaza, pH 8,0, T 60 °C, koncentracija supstrata 5,0-20,0%, E/S odnos 5%.

Ovakvo smanjenje dužine peptidnih lanaca pogoduje budućim primenama dobijenih hidrolizata u sistemima i formulacijama proizvoda za osobe obolele od celijačne bolesti, osobe koje su osetljive na gluten i njegove proteine nakon dospevanja u tanko crevo (*lamina propria*). Nakon 15 min enzimske hidrolize, procenjena dužina peptidnih lanaca bila je u opsegu 10–16. Nakon 190 min hidrolize Alkalazom, srednja dužina peptidnih lanaca hidrolizata proteina brašna imala je vrednost u opsegu 5,43–4,25 ostataka po lancu. Međutim, hidrolizati brašna sa analognim srednjim dužinama peptidnih lanaca mogu imati značajno različit raspored molekulskih masa peptida. Ipak, ovi podaci

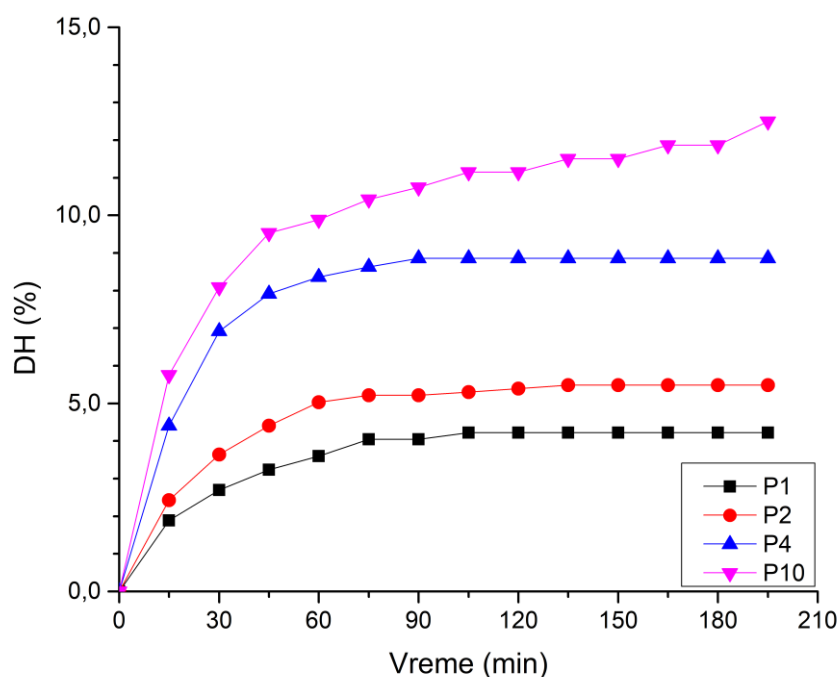
daju nadu s obzirom da je poznato da peptidni lanci koji se sastoje od manje od 9 aminokiselina se smatraju bezbednim za osobe osetljive na gluten i osobe obolele od celijačne bolesti (Sollid, Qiao, Anderson, Gianfrani, & Koning, 2012). Alergenost ovih uzoraka je potom ispitana kompetitivnim ELISA testom kako bi potvrdili dosadašnje rezultate. Raspored molekulskih masa se razlikuje između hidrolizata i usko je povezan sa dužinom peptidnih lanaca. Iako imaju slične vrednosti APCL, dobijeni hidrolizati se mogu razlikovati u raspodeli srednje vrednosti molekulskih masa peptida. Na osnovu propisa prema *Codex Alimentarius* (FAO, CODEX STAN 118-1979 (2008), 2015) sva hrana koja u sebi sadrži gluten može se smatrati bezglutenskom ukoliko sadrži manje od 20 mg glutena po 1 kg, određeno propisanim metodama. Sadržaj glutena je određen u netretiranom sirovom brašnu kao i u hidrolizatima pšeničnog brašna. Kompetitivni ELISA test je manje podložan eksperimentalnim greškama u poređenju sa sendvič ELISOM, s obzirom da je za reakciju potrebno samo jedno vezujuće mesto na antigenu za razliku od drugog testa gde su potrebna dva vezujuća mesta da stupe u reakciju, što smanjuje osetljivost analize. Ovaj oblik testa je brži, fleksibilniji, robusniji i ima visok stepen ponovljivosti rezultata u poređenju sa sendvič ELISA testom. Takođe, upotrebom kompetitivnog ELISA testa nije potrebno naknadno obrađivati uzorak, stoga sirovi i uzorci koji u sebi sadrže nečistoće se mogu koristiti. Glavni nedostatak ove metode ogleđa se u riziku od kros-reaktivnosti i nespecifičnog vezivanja, koje se smanjuje upotrebom primarnih monoklonskih antitela poreklom iz različitih vrsta (Aydin, 2015).

Primenom enzimskog tretmana sirovo pšenično brašno je obrađeno na način na koji je smanjen ukupan sadržaj glutena do nivoa koji je prihvatljiv po internacionalnim standardima. Sadržaj glutena u sirovom brašnu je određen i iznosi $161,80 \pm 2,0$ ppm, što nedvosmisleno prevazilazi propisani nivo sadržaja glutena koji se može smatrati bezbednim za upotrebu u prehrambenim proizvodima za osobe osetljive na gluten. Izmereni sadržaj glutena u hidrolizatima brašna (u daljem tekstu HB) značajno je smanjen u odnosu na polaznu sirovinu. Sadržaj glutena zabeležen za uzorak HB 5,0% (w/w) je $43,80 \pm 4,0$ ppm, za HB 10,0% (w/w) $28,48 \pm 2,4$ ppm i za HB 15,0% (w/w) samo $9,42 \pm 1,5$ ppm. Primenom Alkalaze za hidrolizu sirovog pšeničnog brašna postignuto je zadovoljavajuće smanjenje sadržaja glutena u hidrolizatima. Sva tri proizvedena hidrolizata bi se potencijalno mogla smatrati bezbednim za dalju primenu u prehrambenim proizvodima i drugim formulacijama. Hidrolizati brašna 5,0% (w/w) i 10,0% (w/w) se na osnovu vrednosti sadržaja glutena mogu svrstati u proizvode sa smanjenim sadržajem glutena, ali se ne mogu voditi kao bezglutenski s obzirom na to da vrednost sadržaja glutena upada u opseg vrednosti 20–100 mg/kg. Međutim, HB 15% (w/w) sa sadržajem glutena od $9,42 \pm 1,5$ ppm se potencijalno može smatrati bezglutenskim proizvodom koji bi bio bezbedan za primenu u prehrambenim proizvodima i drugim formulacijama. Ovi rezultati pokazuju da je prisustvo ugljenih hidrata imalo pozitivan uticaj na smanjenje sadržaja alergenihi epitopa. Naime, povećanjem količine skrobnih materija i smanjenjem sadržaja dostupne vode postignuto je značajno smanjenje sadržaja alergenihi epitopa. Ovim postupkom su proteini glutena uspešno modifikovani tako da su im funkcionalna svojstva očuvana ili čak unapređena.

9.4.3. Hidroliza Pronazom

Sirovi pšenični gluten je hidrolizovan i enzimom Pronaza (na engl. Pronase®) u cilju ispitivanja mogućnosti primene još jednog nespecifičnog enzima, poreklom iz *Streptomyces griseus*. Proizvođač ovog enzima je isti okarakterisao tako da je namenjen samo za dijagnostičke svrhe, i nije naznačeno da ima dozvolu za primenu u sistemima namenjenim za ljudsku ishranu. Stoga, ovaj deo doktorske disertacije predstavlja u nekom pogledu eksperimentalno-teorijski deo, koji se bavi potencijalnom primenom ovog enzima i njegovim uticajem na strukturu proteina glutena. Primenom uslova opisanim u poglavlju 7.2.9 enzim Pronaza je pokazao određeni afinitet prema proteinskim frakcijama glutena. Unosom 1mg ovog enzima postignut je stepen hidrolize od 4,23% (P1), 2 mg je rezultovalo u nešto višem stepenu hidrolize od 5,48% (P2), 4 mg u 8,85% (P4), dok je najviši stepen hidrolize postignut primenom 10 mg ovog enzima, 12,50% (P10). Sa povećanjem unete količine enzima postepeno je došlo do porasta i stepena hidrolize. Promena prosečne dužine peptidnih lanaca tokom hidrolize data je u prilogu (Slika P1). Svim uzorcima je nakon hidrolize izmerena i alergenost

pomoću ELISA testa, i uočeno je da sa porastom stepena hidrolize dolazi do smanjenja sadržaja alergeni epitopa. Najveće smanjenje zabeleženo je kod uzorka sa postignutim najvećim stepenom hidrolize (P10), koji je zadržao 27,17% alergeniosti u poređenju sa netretiranim glutenom. Uzorci P1, P2 i P4 su zadržali 58,21%, 87,03% i 42,32% početnih alergeni svojstava. Na **Slici 9.4.4** prikazan je tok enzimske hidrolize glutena pomoću Pronaze. S obzirom na to da je enzim pokazao određeni afinitet prema proteinima glutena, kao i određenu efikasnost u pogledu smanjenja količine alergeni epitopa, možemo zaključiti da ovaj enzim potencijalno može biti interesantan u nekim budućim istraživanjima.



Slika 9.4.4. Tok enzimske hidrolize glutena enzimom Pronaza.

9.5. Strukturne promene

9.5.1. Uticaj mikrotalasnog tretmana na strukturne promene glutena

9.5.1.1. FTIR analiza

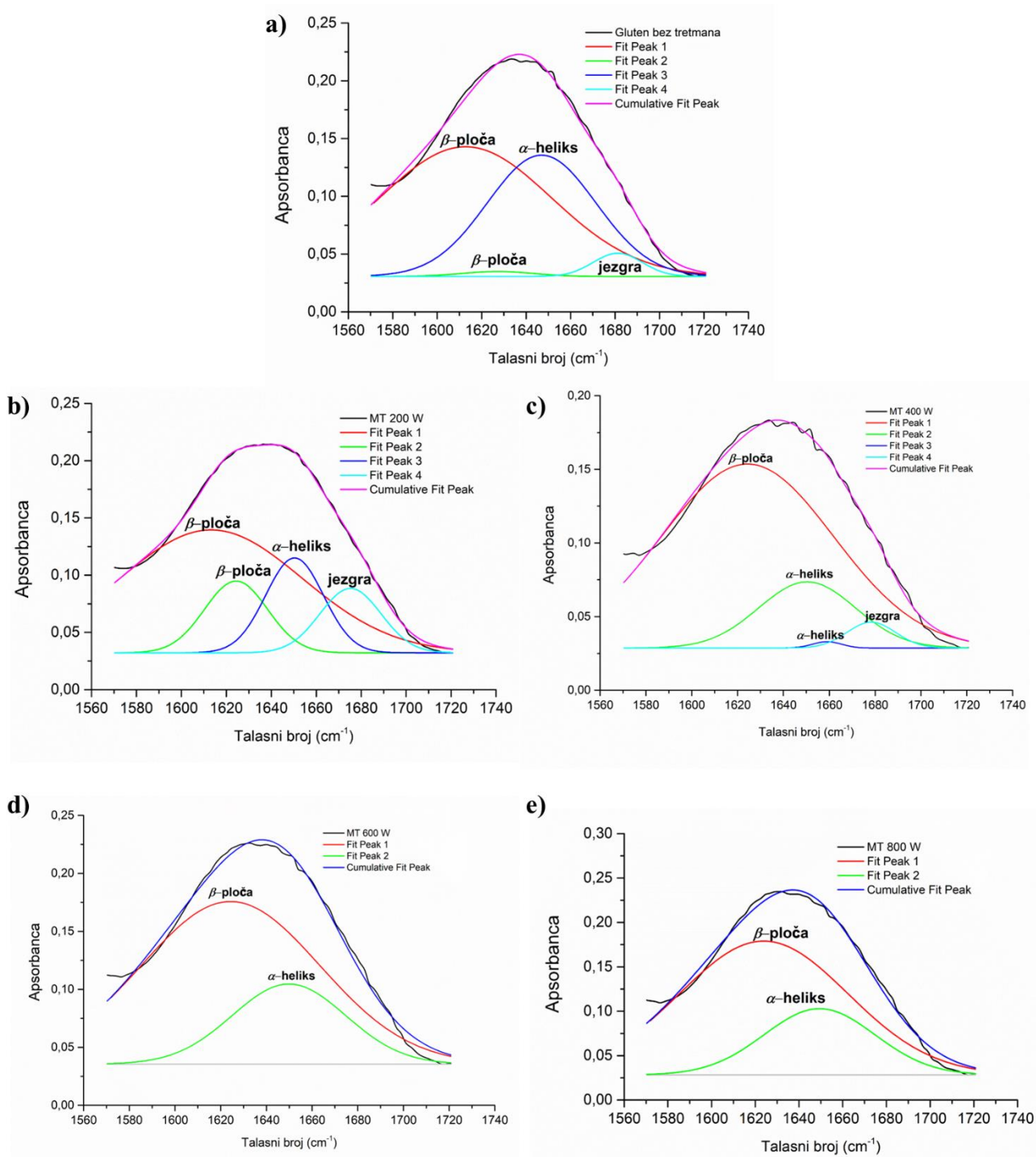
Strukturne promene unutar model proteina glutena uzrokovane primenom mikrotalasnog i toplotnog tretmana, ali i enzimske hidrolize su opisane u ovom delu disertacije. Promene u sekundarnoj strukturi proteina koje se dešavaju usled uticaja mikrotalasnog zračenja na žitarice i mahunarke se ogledaju u amid I regiji. Za mahunarke (crveno sočivo, leblebije, grašak...) (Divekar, et al., 2017) zabeleženo je da pod uticajem mikrotalasnog zračenja trpe određene promene u sekundarnoj strukturi proteina. Konkretno se značajne razlike uočavaju u regiji $1600\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$, a u kojoj se nalaze β -ploče, pri čemu se ta promena objašnjava ili raskidanjem vodoničnih veza ili u popuštanju strukture ploče. Za pšenicu je moguće naći u literaturi da izlaganjem pšeničnog brašna mikrotalasnom zračenju dolazi do promena u strukturi i funkcionalnih svojstava glutena, pri čemu je smanjena kohezivnost između čestica. Bitno je napomenuti da se sadržaj proteina nakon izlaganja mikrotalasnom zračenju nije promenio (Walde, Balaswamy, Velu, & Rao, 2002). Uticaj kontrolisanog mikrotalasnog pretretmana na promene u sekundarnoj strukturi proteinskih frakcija glutena i hidrolizatima analizirano je FTIR metodom, dato u prilogu (**Slika P2**). Dekonvolucijom Amid I trake (**Slike 9.5.1 i 9.5.2**) kontrolnog uzorka glutena, mikrotalasno pretretiranog glutena i mikrotalasno tretiranog glutena uz naknadnu enzimsku hidrolizu, moguće je ispitivanje glavnih

elemenata sekundarne strukture proteina. Naime, ispitani su relativni intenziteti produženih β -ploča ($1623\text{--}1641\text{ cm}^{-1}$), intermolekulskih β -ploča (1612 cm^{-1}), α -heliksa ($1648\text{--}1657\text{ cm}^{-1}$) i jezgara ($2\text{--}7\ \alpha$ -heliksa namotani zajedno; $1662\text{--}1686\text{ cm}^{-1}$). Relativni intenziteti ovih glavnih delova sekundarne strukture proteina su sumirani u **Tabeli 9.3**. Sekundarna struktura uzoraka glutena i hidrolizata je značajno promenjena kada je uzorak tretiran mikrotalasnim snagama u opsegu $200\text{--}800\text{ W}$, u poređenju sa uzorkom koji nije tretiran (kontrolni uzorak).

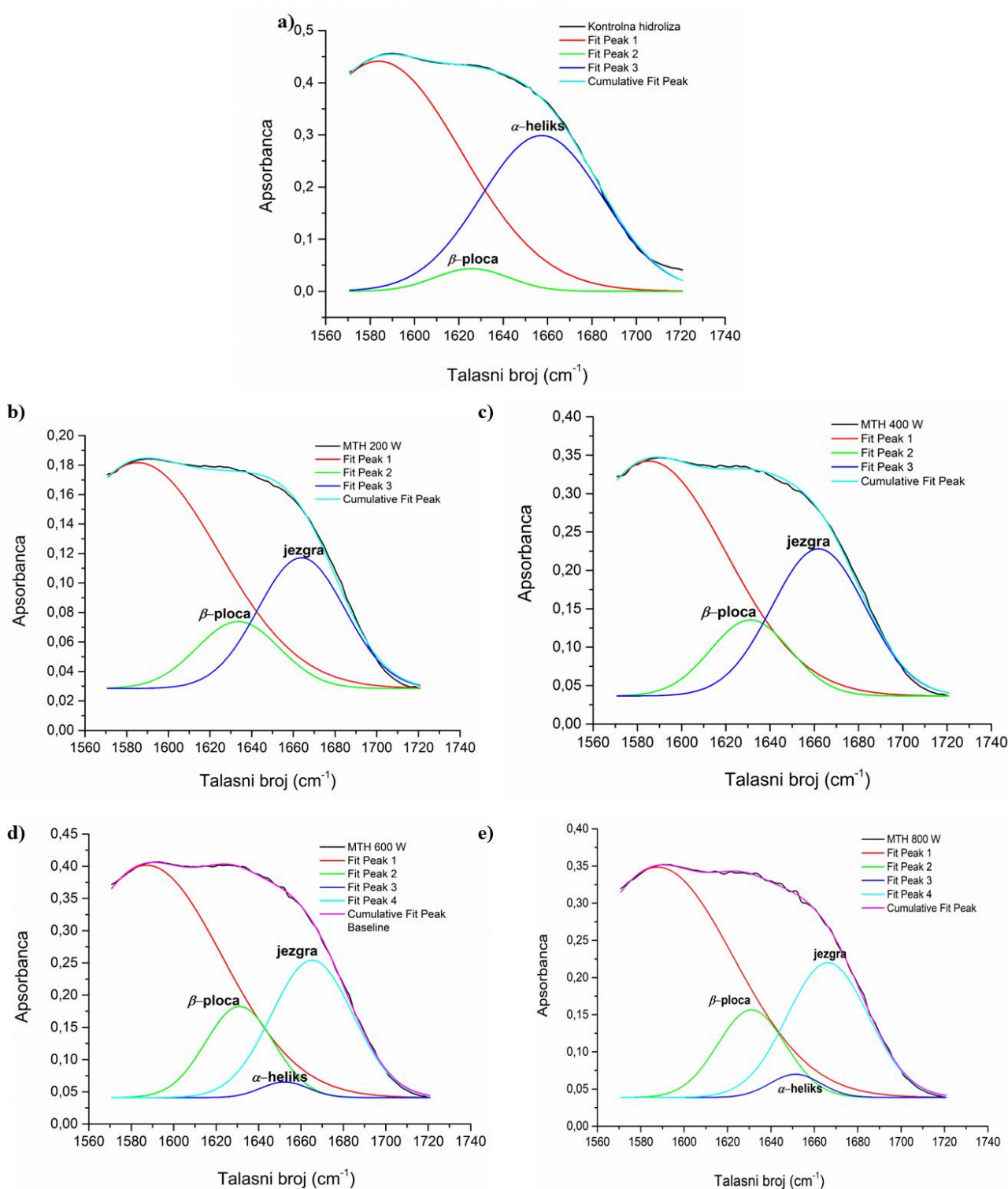
Primenom snage od 200 W , ukupan sadržaj α -heliksa je smanjen, dok je sadržaj β -ploča i jezgara povećavan tokom vremena. Sa povećanjem primenjene snage sa 200 na 800 W , doprinos α -heliksa je značajno izmenjen. Može se naglasiti da su intermolekulske β -ploče i α -heliksi proteina glutena, bez pretretmana i nakon mikrotalasnog pretretmana, pronađeni u unutrašnjosti polipeptidnih lanaca. Naborane β -ploče (na primer, β -zavoji) nastali su usled reverzije polipeptidnih lanaca samo nakon mikrotalasnih tretmana sa 400 , 600 i 800 W . Do proboja β -heliksa i naborane β -ploče je došlo usled doprinosa mikrotalasnog zračenja u reaktorskom sistemu na formiranje disulfidnih veza, što je u saglasnosti sa rezultatima objašnjenim na **9.4.2a** ili izo-peptidnim vezama (Mahroug, et al., 2019; Xiang, Zou, Liu, & Ruan, 2020).

Sa druge strane, intenzitet traka zabeleženih u hidrolizatima nakon mikrotalasnog pretretmana, pokazuje da je mikrotalarno zračenje doprinelo olakšanoj enzimskoj hidrolizi. Smanjenje u ukupnom sadržaju α -heliksa u sekundarnoj strukturi, upućuje na to da postoji drugačija organizacija polipeptidnih veza u hidrolizatima mikrotalarno pretretiranih uzoraka glutena, pogotovo nakon primena snaga od 200 W i 400 W . Na osnovu ovih opažanja, možemo reći da je kombinacija mikrotalasnog pretretmana i enzimske hidrolize Alkalazom dovela do isticanja intermolekulskih reakcija, stoga je izražena strukturna reorganizacija α -heliksa u jezgra ($28,0\%$ i $31,3\%$ za 200 i 400 W , respektivno), i izmenjen ukupni relativni sadržaj bočnih lanaca ($58,3\%$ za 200 W). Struktura naborane β -ploča je značajno izmenjena nakon sinergističkog uticaja mikrotalasnog pretretmana i hidrolize Alkalazom, što ukazuje na to da su delimično hidrolizovani polipeptidni lanci formirali stabilnije strukture, koje mogu biti ključne za dalja tehno-funkcionalna svojstva i alergnost. Dalje, glavne apsorpcione trake proteina pojavljuju se usled priustva vibracija istezanja $\text{C}=\text{O}$ grupe ($\approx 1645\text{ cm}^{-1}$) amid I trake i N-H vibracije savijanja u ravni (1545 cm^{-1}) amid II trake (Pearce & Kinsella, 1979; Stefanović, et al., 2018). Primetne promene u spektru hidrolizata glutena su opažene u regiji Amidnih traka I i II ($\approx 1700\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$). Netretirani uzorak glutena pokazuje oštru traku na $\approx 1633\text{ cm}^{-1}$ (Slika P3, koja menja svoj oblik kao što je prikazano u Slika P4), gde su svi hidrolizati pokazali traku na $\approx 1590\text{ cm}^{-1}$, koja je pretpostavlja se rezultat strukturnih promena u sekundarnoj strukturi proteina. Apsorpcioni pikovi u opsegu talasnih dužina $3100\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ (Amid A), koji se pripisuju N-H i O-H vibracijama hidrosilnih grupa, su promenili svoj oblik i intenzitet nakon mikrotalasnog pretretmana usled interakcija OH vibracija molekula vode i N-H istezanja prouzrokovanog enzimskom hidrolizom proteina glutena. Primenjeni mikrotaladni tretman je doveo do promena u intenzitetu zateznih vibracija C-H_2 , C-H i $=\text{C-H}$ veza na talasnim dužinama 1450 , 1456 , 2933 i 3060 cm^{-1} , koje mogu biti povezane hidrofobnim interakcijama i promenama u konformaciji molekula usled dejstva elektromagnetnih talasa.

U poređenju sa kontrolnom hidrolizom, zabeležene su izraženije apsorpcione trake kod svih hidrolizata proteina glutena sa mikrotalasnim pretretmanom u opsegu talasnih dužina $1300\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$, koje odgovaraju Amid I i Amid II regijama. Ovo ukazuje na to da je došlo do strukturnih promena unutar amidnih veza. Ovo se prvenstveno ogleda u gubitku pikova na 1516 cm^{-1} u poređenju sa kontrolnom hidrolizom bez pretretmana. Međutim, dodatno povećanje intenziteta pika na 1651 cm^{-1} je opaženo kod svih hidrolizata dobijenih sa mikrotalasnim pretretmanom, u poređenju sa kontrolom. Porast u intenzitetu pika je potvrda o postojanju određene količine α -jezgra unutar strukture hidrolizata. Neophodno je istaći da je u Amid VI regiji na 560 cm^{-1} zabeleženo smanjenje intenziteta traka kod svih hidrolizata glutena, kao i promene kod samo mikrotalarno pretretiranog glutena u poređenju sa kontrolnim netretiranim uzorkom glutena. Vibracije S-S veza se detektuju na ovoj talasnoj dužini, stoga možemo potvrditi da je mikrotaladni pretretman zaista doveo do promena u broju disulfidnih veza. Ovo opažanje daje potvrdu prethodnoj tvrdnji da mikrotaladni pretretman deluje u vidu povećanja/smanjenja sadržaja sulfhidrilnih grupa u molekulima proteina glutena.



Slika 9.5.1. Dekonvolucija pika amid I regije ($1,700\text{--}1,600\text{ cm}^{-1}$) proteina glutena u FTIR spektru a) bez pretretmana i sa pretretmanom mikrotalasima snage b) 200 W, c) 400 W, d) 600 W i e) 800 W pomoću funkcija „Peak and Baseline“ (podešavanje bazne linije, dekonvolucija, drugi izvod i metoda fitovanja podataka po Gausu) u programu OriginPro Lab 9.0.



Slika 9.5.2. Dekonvolucija pika amid I regije ($1,700\text{--}1,600\text{ cm}^{-1}$) hidrolizata proteina glutena u FTIR spektru a) bez pretretmana i sa pretretmanom mikrotalasima snage b) 200 W, c) 400 W, d) 600 W i e) 800 W pomoću funkcija „Peak and Baseline“ (podešavanje bazne linije, dekonvolucija, drugi izvod i metoda fitovanja podataka po Gausu) u programu OriginPro Lab 9.0.

Tabela 9.3. Sadržaj (%) sekundarne strukture u mikrotalasno tretiranim uzorcima i u hidrolizazima mikrotalasno tretiranih uzoraka (Alkalaza, pH 8,0, T 60°C).

Sekundarna struktura	Sadržaj (%) sekundarne strukture u mikrotalasno tretiranim uzorcima				
	Bez tretmana	200 W	400 W	600 W	800 W
α -heliks	38,9%	16,6%	17,3%	25,6%	26,2%
Nasumična jezgra	n.o.	n.o.	0,49%	n.o.	n.o.
β -ploča (naborana)	1,03%	13,7%	78,8%	74,4%	73,8%
β -ploča (intermolekularna)	56,8%	57,7%	n.o.	n.o.	n.o.
Jezgra	3,36%	11,9%	3,04%	n.o.	n.o.

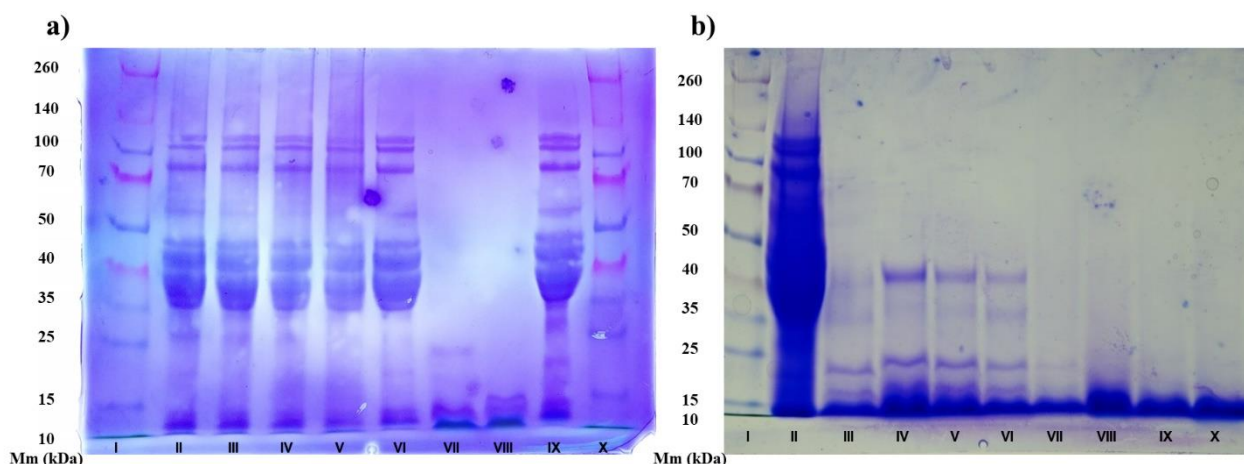
Sekundarna struktura	Sadržaj (%) sekundarne strukture u hidrolizazima mikrotalasno tretiranih uzoraka				
	Bez tretmana	200 W	400 W	600 W	800 W
α -heliks	41,9%	n.o.	n.o.	1,77%	2,80%
β -ploča (naborana)	3,77%	13,7%	13,8%	14,8%	14,1%
Jezgra	n.o.	28,0%	31,3%	26,6%	26,0%
Bočni lanci	54,3%	58,3%	54,9%	56,8%	57,2%

*n.o. – nije određeno

9.5.1.2. SDS-PAGE elektroforeza

Uzorci proteina glutena koji nisu tretirani i/ili hidrolizovani, mikrotalasno pretretirani i mikrotalasno pretretirani i potom hidrolizovani su analizirani pomoću SDS-PAGE elektroforeze kako bi se ispitalo da li je došlo do denaturacije ili agregacije molekula proteina (**Slika 9.5.3**). Rezultati SDS-PAGE elektroforeze (**Slika 9.5.3a**) pokazuju da proteini frakcija gliadina i glutenina nakon mikrotalasnog tretmana (200–800W) nisu podlegli značajnim promjenama što se vidi iz priloženih elektroforetskih profila. U poređenju sa netretiranim kontrolnim glutenom, nije zabeležena pojava nestanka i formiranja novih traka, dakle broj proteinskih traka je ostao isti. Ovaj elektroforetski profil mikrotalasno tretiranih uzoraka glutena pokazao je da uticaj mikrotalasa nije imao efekta na primarnu strukturu proteina, stoga mikrotalasni tretman sa kontrolisanom temperaturom nije imao uticaj u vidu hidrolize proteinskih frakcija glutena čak i pri visokim temperaturama. Ovi rezultati su u skladu sa literaturno dostupnim podacima, u kojima se navodi da elektromagnetno zračenje dobijeno dejstvom mikrotalasne pećnice ne može modifikovati primarnu strukturu proteina, s obzirom na to da je energija hemijskih veza superiornija od kvantne energije mikrotalasa (Mahroug, et al., 2019; Han, Cai, Cheng, & Sun, 2018). SDS-PAGE elektroforeza je pokazala značajne razlike u profilima između dva ispitana hidrolizata, netretiranog hidrolizata glutena i mikrotalasno tretiranog hidrolizata glutena (**Slika 9.5.3b**). Potpuno odsustvo frakcija proteina sa molekulskim masama većim od 45 kDa, nakon postupka enzimske hidrolize, je opaženo u oba slučaja. Međutim, razlika u detektovanim frakcijama proteina je zabeležena u slučaju molekulskih masa manjih od 50 kDa. Za mikrotalasno pretretirani (200 W) hidrolizat glutena uočeno je potpuno odsustvo frakcija gliadina i glutenina u opsegu molekulskih masa 25–50 kDa. Odsustvo frakcija koje po elektroforetskom profilu odgovaraju LMW-GS i ω -1,2-gliadinima (32–39 i 39–44 kDa, respektivno) i α/β -gliadinima (31–35 i 28–35 kDa, respektivno) se može pripisati uticaju mikrotalasnog pretretmana na frakcije gliadina i glutenina. S obzirom na to da kontrolni hidrolizat glutena nije prošao nikakav toplotni tretman pre enzimske hidrolize, osim standardnog postupka ekvibracije na 60 °C, očigledno je da je brza i kratka primena mikrotalasne snage od 200 W bila dovoljna da indukuje promene u frakcijama proteina glutena, čineći ih dostupnijim enzimu. Istraživanje sprovedeno od strane Singa i Mekričija (Singh, MacRitchie) (Singh & MacRitchie, 2004) je pokazalo da se polimerizacija glutenina dešava pri temperaturama ispod 100 °C, dok gliadini polimerizuju pri višim temperaturama. Kompetitivni ELISA test je

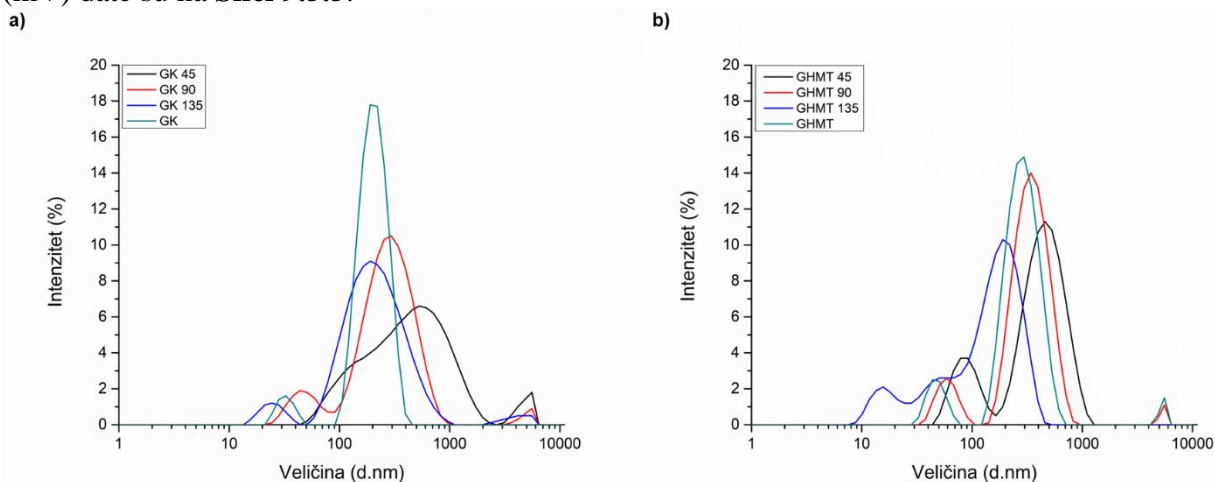
nagovestio da mikrotalasni tretman pšeničnog glutena smanjuje količinu detektovanog glutena do određenog nivoa, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Wang & Damodaran, 1990).



Slika 9.5.3. SDS-PAGE profili proteinskih frakcija glutena, mikrotalasno tretirani gluten pri različitim snagama mikrotalasa (200–800 W), kontrolna hidroliza glutena i mikrotalasno pretretirani hidrolizat glutena (200W). (a) Traka: I— standard proteina, II—MT 200 W, III—MT 400 W, IV—MT 600 W, V—MT 800 W, VI—Gluten, VII— GK, VIII—MTH 200 W, IX—Gluten, X— standard proteina; (b) Traka: I— standard proteina, II—Gluten, III—GK, IV—GK – 45 min, V— GK – 90 min, VI— GK – 135 min, VII—GHMT, VIII— GHMT – 45 min, IX— GHMT – 90 min, X— GHMT – 135 min.

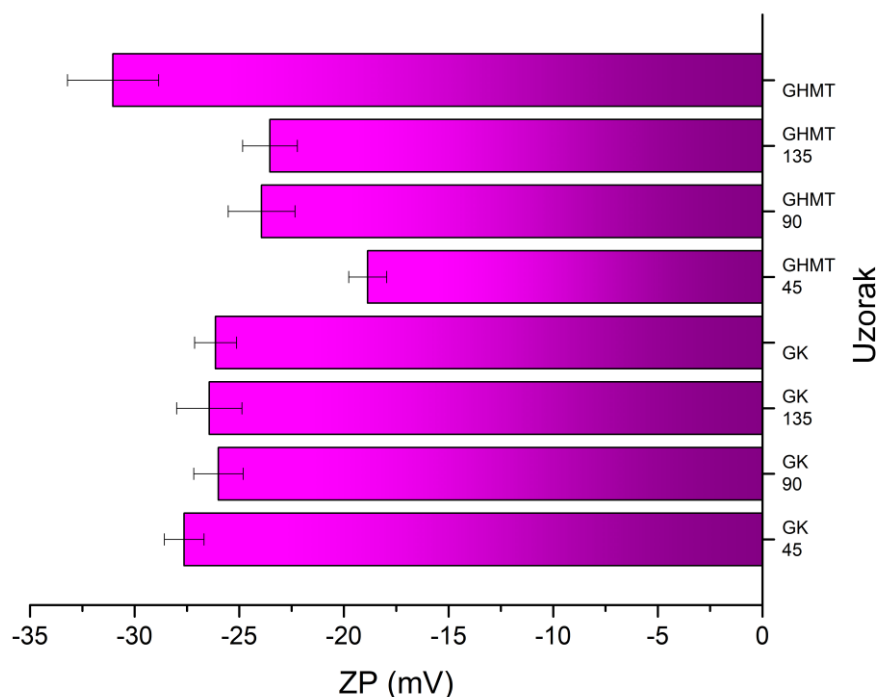
9.5.1.3. Agregacione karakteristike proteinskih frakcija glutena

Raspodela veličina čestica i zeta potencijal hidrolizata mikrotalasno pretretiranog glutena i kontrolnog uzorka su određeni kako bi se dodatno ispitaio uticaj mikrotalasa na strukturu proteina glutena. Uočeno je da se u slučaju oba hidrolizata veličine čestica kreću u opsegu veličina 100–1 000 nm. Na Slici 9.5.4a,b se može uočiti trend smanjenja veličina čestica sa povećanjem stepena hidrolize. Najzastupljenije su čestice u opsegu veličina 100–700 nm, dok sa povećanjem stepena hidrolize dolazi do smanjenja prisutnih čestica u opsegu veličina 1 000–10 000 nm. Iako prisutne, čestice tako velikih dimenzija uprkos tome zauzimaju veliki deo zapremine. Može se uočiti razlika u intenzitetu između izmerenih frakcija oba hidrolizata. Srednje vrednosti veličine i koeficijenti raspodele dati su u Tabeli 9.4. Vrednosti zeta potencijala koje su merene kao apsolutne vrednosti (mV) date su na Slici 9.5.5.



Slika 9.5.4. Raspodela veličina čestica hidrolizata glutena a) netretirani (GK, kontrolna hidroliza) i b) mikrotalasno pretretirani hidrolizat glutena (GHMT); Alkalaza, pH 8,0, T 60°C.

Trend izmerenih vrednosti zeta potencijala se razlikuju kod mikrotalasno pretretiranog hidrolizata u odnosu na kontrolnu hidrolizu. Sa porastom vremena i stepena hidrolize postepeno dolazi do povećanja apsolutne vrednosti zeta potencijala, pri čemu krajnji mikrotalasno pretretirani hidrolizat pokazuje najveću vrednost, $-31,03 \pm 2,18$ mV. Ova vrednost je statistički značajno različita od ostalih ($p < 0,05$). Zabeležene vrednosti Z-potencijala ukazuju na to da oba hidrolizata imaju dobru fizički stabilnost i da ne postoji velika mogućnost formiranja agregata. Na osnovu premerenih vrednosti možemo zaključiti da mikrotalasni tretman daje doprinos u pogledu stabilnosti rastvora hidrolizovanih proteina.



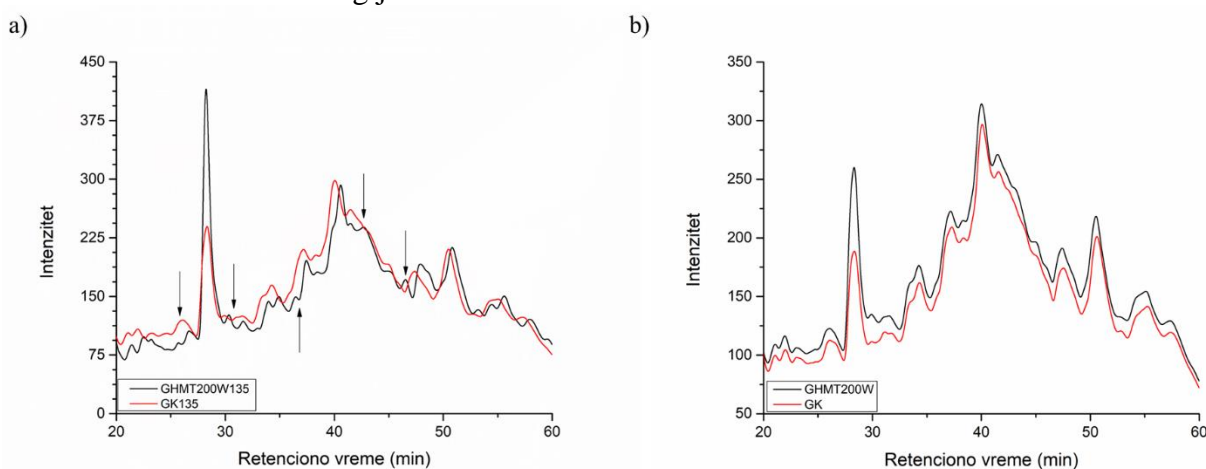
Slika 9.5.5. Zeta potencijal (mV) hidrolizata glutena a) netretirani (GK, kontrolna hidroliza) i b) mikrotalasno pretretirani hidrolizat glutena (GHMT); Alkalaza, pH 8,0, T 60°C.

Tabela 9.4. Srednje vrednosti veličine i polidisperzni indeks (netretirani i mikrotalasno pretretirani, Alkalaza, pH 8,0, T 60°C). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3).

Uzorak	Srednja Z-vrednost	PdI
GK 45	299,27 ± 6,23	0,52 ± 0,02
GK 90	195,83 ± 1,30	0,46 ± 0,01
GK 135	156,80 ± 5,72	0,37 ± 0,07
GK	221,67 ± 23,08	0,35 ± 0,03
GHMT 45	283,40 ± 13,97	0,49 ± 0,17
GHMT 90	270,60 ± 12,84	0,41 ± 0,05
GHMT 135	113,93 ± 15,71	0,51 ± 0,10
GHMT	234,43 ± 3,49	0,44 ± 0,03

9.5.1.4. RP-HPLC hromatogrami hidrolizata glutena

Primenom reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom su dodatno ispitane razlike u hemijskom sastavu i profilu peptida i polipeptida između krajnjih hidrolizata glutena, netretiranog i mikrotalasno pretretiranog (200 W) hidrolizata. Na osnovu hromatograma prikazanih na **Slici 9.5.6** možemo uočiti nekoliko razlika u hromatografskim profilima ispitivanih hidrolizata. Očigledno je da je enzim Alkalaza različito delovao na netretirani i mikrotalasno pretretirani gluten. Sa hromatograma se vide promene u delovanju enzima na polarnije peptidne sekvence glutena, dok se sa daljim smanjenjem polarnosti uočava odsustvo pikova kod netretiranog glutena. Naime, u slučaju mikrotalasno pretretiranog glutena dolazi do pojave više sitnih pikova, dok se nasuprot tome kod netretiranog hidrolizata uočava prisustvo aglomerata. Na osnovu ovih hromatograma možemo pretpostaviti da je mikrotalasni pretretman imao uticaj na peptidne frakcije glutena, pri čemu je došlo do promene u sekundarnoj strukturi proteina, čime je enzimu omogućen drugačiji pristup eptiopima, a samim tim i omogućeno lakše raskidanje veza. Razlike u hromatogramima su u skladu sa prethodno prikazanim rezultatima SDS-PAGE elektroforeze, gde su takođe uočene promene i razlike između uzoraka u HMW i LMW regijama.



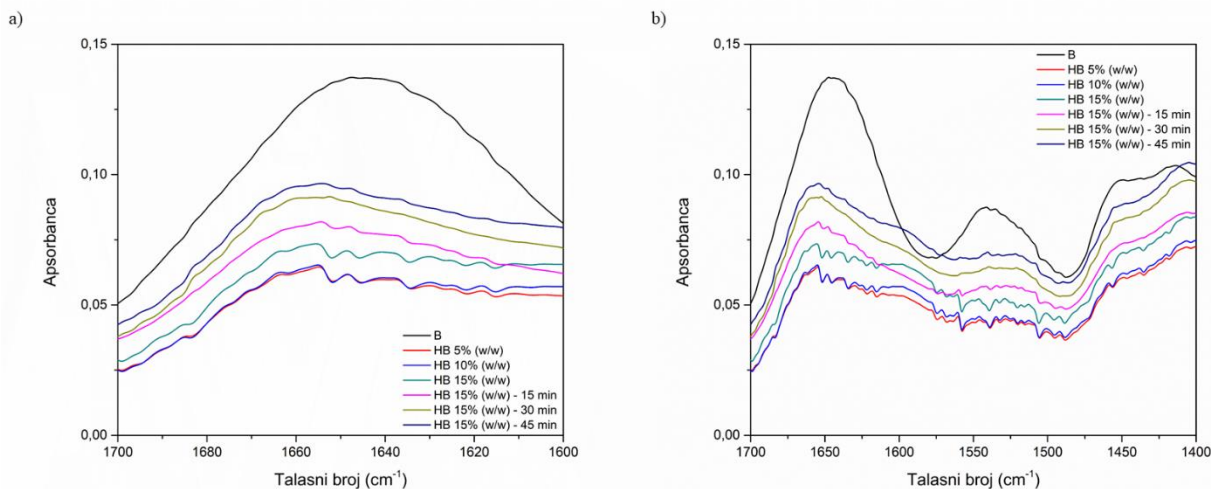
Slika 9.5.6. RP-HPLC hromatografski profili netretiranog i mikrotalasno pretretiranog (200W) hidrolizata glutena.

9.5.2. Uticaj delovanja proteolitičkih enzima na strukturne promene proteina glutena prilikom hidrolize komercijalnog pšeničnog brašna

9.5.2.1. FTIR analiza

FTIR analiza je korišćena kako bi se ispitala promene u sekundarnoj strukturi proteina pšeničnog brašna uzrokovane enzimskom hidrolizom. Kako bi se potvrdile nastale promene u konformaciji i strukturi proteina iz pšeničnog brašna pre i nakon enzimskog tretmana meren je infracrveni spektar u regiji $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, Trake u infracrvenoj regiji (IR) $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ su povezane sa O-H i N-H istezanja, dok istezanja u regiji $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ vode poreklo od C-H veza (Coates, 2000). Prevažodno, analizirani su hidrolizati u kojima je hidroliza izvedena do kraja, 195 min, međutim kod uzorka koji je imao koncentraciju supstrata 15% (hidrolizata koji je dao najveći stepen hidrolize i najveću promenu alergenosti) analiziran je i uticaj vremena delovanja enzima na strukturna svojstva. Konkretno, praćena je promena strukture, i tom prilikom potvrđena je velika specifičnost endopeptidaze Alkalaze prema pšeničnom brašnu kao proteinskom supstratu. Zabeležene su značajne promene u strukturi u oblastima amidnih regija I i II, pri čemu su očigledne promene nakon samo 15 min hidrolize. Produženim delovanjem enzima, ove promene su postale izraženije. U amid I regiji ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$, **Slika 9.5.7a**) koja je prisutna usled C=O istezanja u proteinima, primećene su značajne promene nakon enzimske hidrolize u svim analiziranim uzorcima hidrolizata, i to u vidu smanjenja intenziteta traka i pojavom novih pikova manjeg intenziteta. Primetne promene

su zabeležene u amid II regiji ($1480\text{--}1575\text{ cm}^{-1}$, **Slika 9.5.7b**) usled N-H savijanja u ravni i C-N istežanja ([Garidel & Schott, 2006](#)), takođe u uzorcima svih analiziranih hidrolizata u poređenju sa netretiranim pšeničnim brašnom.

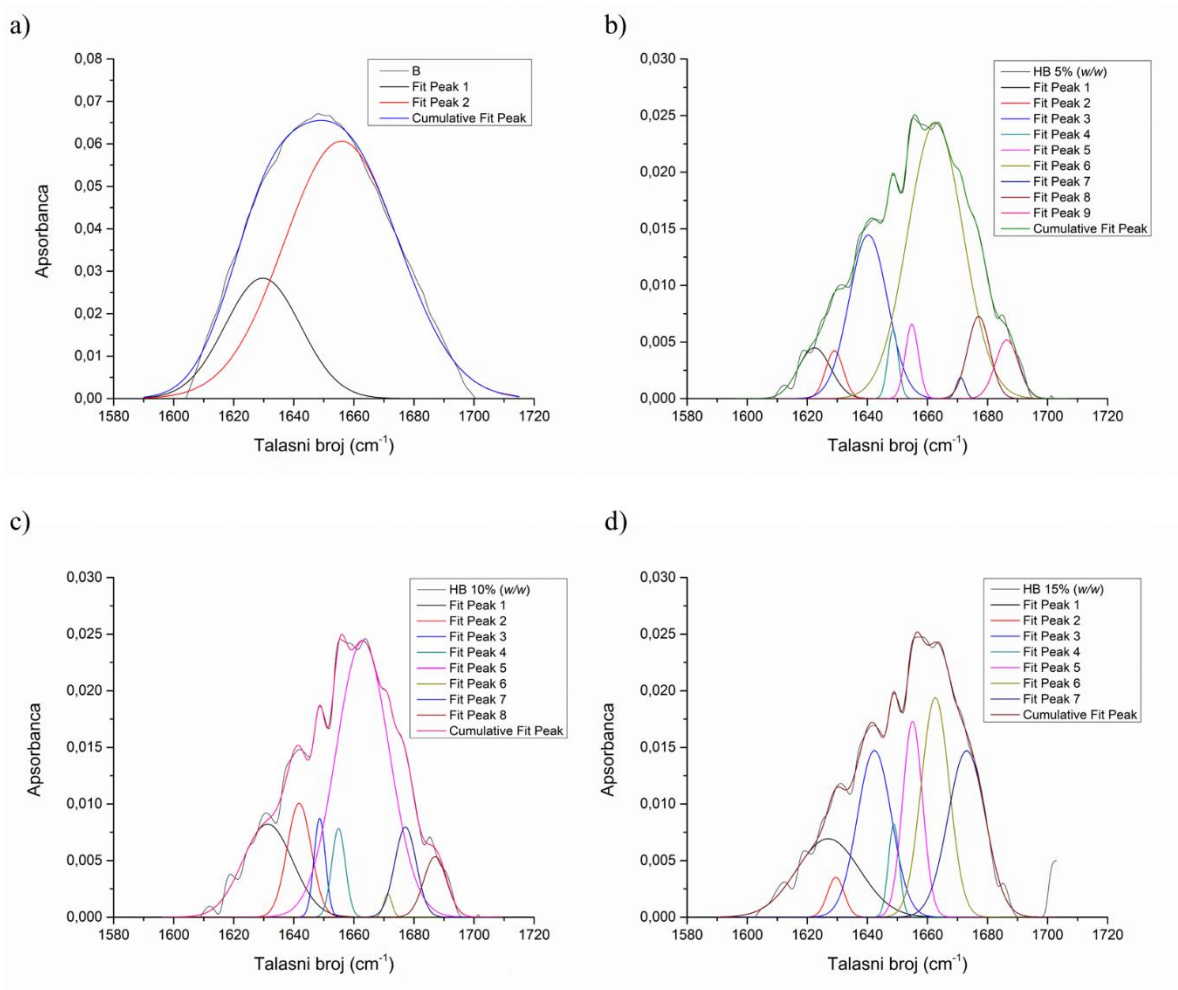


Slika 9.5.7. FTIR spektr a) amid I regije ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) i b) amid II ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) i amid II regije ($1480\text{--}1575\text{ cm}^{-1}$) sirovog brašna (B) i hidrolizata brašna (HB) (Reakcioni uslovi enzimske hidrolize: koncentracija supstrata 5-15%, enzim Alkalaza, E/S odnos 5%, pH 8, T 60°C).

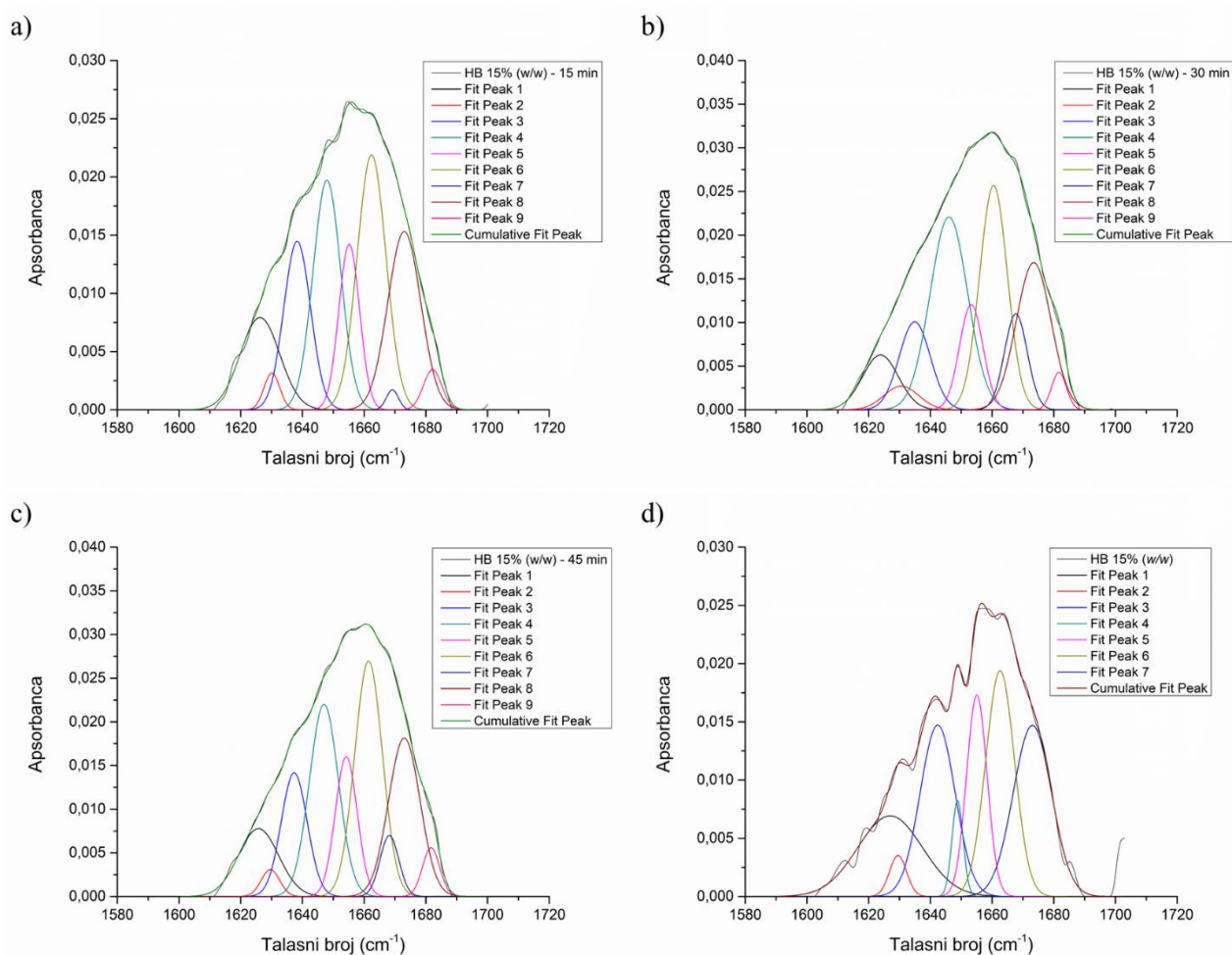
Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživačkih grupa, čime je dodatno potvrđena promena u sekundarnoj strukturi proteina brašna nakon enzimske hidrolize i drugim enzimima ([Cui, Zhao, Zhao, & Chai, 2011](#); [Mohan Kumar, Sarabhai, & Prabhasankar, 2019](#)). Dekonvolucijom snimljenih oblasti spektra svih uzoraka (**Slike 9.5.8 i 9.5.9**) određen je udeo sekundarnih struktura proteina glutena unutar amid I regije. Sekundarne strukture koje su analizirane su: produžena β -ploča ($1623\text{--}1641\text{ cm}^{-1}$), α -heliks ($1648\text{--}1657\text{ cm}^{-1}$) i jezgra (2–7 α -heliksa namotani zajedno; $1662\text{--}1686\text{ cm}^{-1}$). Ovi rezultati prikazani su u **Tabeli 9.5**. Sekundarna struktura hidrolizata brašna promenjena je značajno nakon enzimskog tretmana. Ukupan sadržaj α -heliksa je smanjen, dok je tokom vremena postepeno povećavana količina prisutnih β -ploča i nasumičnih jezgara (15–45 min hidrolize za uzorak HB 15,0% (w/w)). α -heliksi su se strukturno reorganizovali u jezgra (65,11%) u slučaju HB 10,0% (w/w). Iz **Tabele 9.5** može se videti da je došlo do reorganizacije sekundarne strukture u tretiranim uzorcima, tačnije sa povećanjem sadržaja prisutne suve materije sa 5,0 na 15,0% smanjen je sadržaj jezgara (%) i povećan je sadržaj izduženih β -ploča.

Tabela 9.5. Sadržaj sekundarne strukture (%) proteina sirovog brašna i hidrolizata proteina brašna (Alkalaza, pH 8,0, T 60°C).

Uzorak	Sadržaj sekundarne strukture (%)		
	β -ploča (produžena)	α -heliks	Jezgra
Brašno	23,58	76,42	0,00
HB 5% (w/w)	30,20	5,83	64,00
HB 10% (w/w)	26,50	8,40	65,11
HB 15% (w/w)	39,50	17,20	43,27
HB 15% (w/w) - 15 min	26,60	30,00	43,40
HB 15% (w/w) - 30 min	18,83	33,15	48,02
HB 15% (w/w) - 45 min	22,50	30,20	47,29



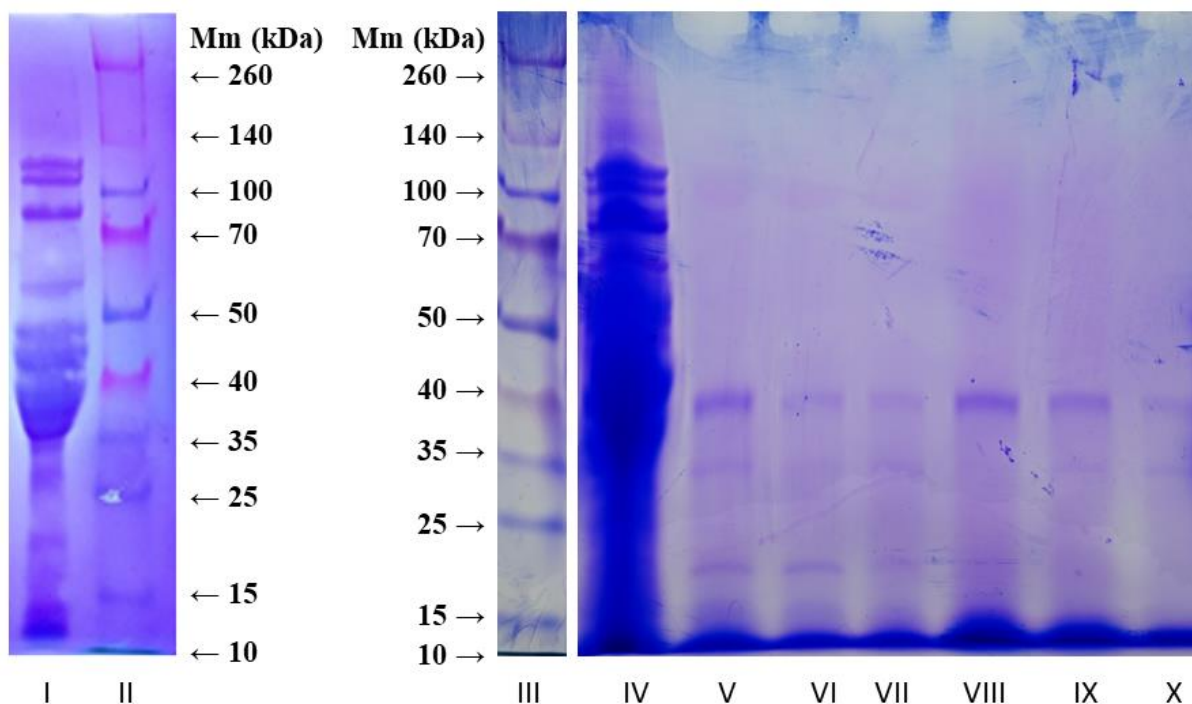
Slika 9.5.8. Dekonvolucija spektra amid I trake (1,700–1,600 cm⁻¹) FTIR spektra proteina glutena poreklom iz brašna (B) i hidrolizata proteina brašna (HB): a) sirovo brašno (kontrola), b) HB 5% (w/w), c) HB 10% (w/w), d) HB 15% (w/w).



Slika 9.5.9. Dekonvolucija spektra amid I trake ($1,700\text{--}1,600\text{ cm}^{-1}$) FTIR spektra proteina glutena poreklom iz hidrolizata proteina brašna (HB): a) HB 15% (w/w) – 15 min, b) HB 15% (w/w) – 30 min, c) HB 15% (w/w) – 45 min, d) HB 15% (w/w).

9.5.2.2. SDS-PAGE elektroforeza

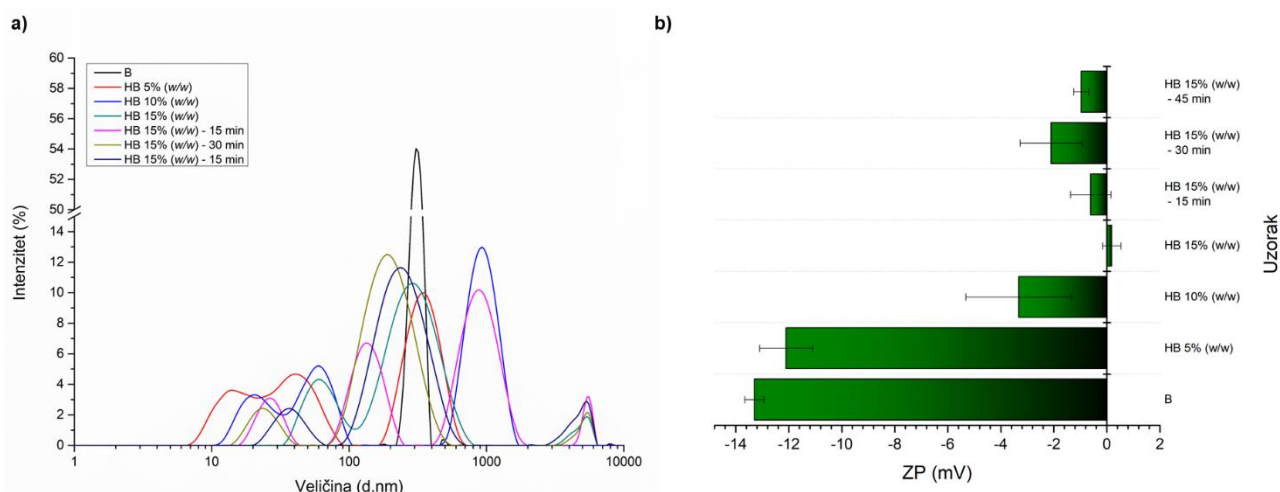
Kako bismo utvrdili promene u strukturi proteinskih frakcija glutena i kakav uticaj ima Alkalaza na njihovu razgradnju, urađena je SDS-PAGE elektroforeza sirovog brašna i hidrolizata brašna. Podaci o promeni u molekulskim masama prikazani su na **Slici 9.5.10**. Traka I prikazuje profil sirovog glutena, trake II i III prikazuju molekulske mase standarda, a traka IV sirovo pšenično brašno. Trake V–X predstavljaju hidrolizate brašna. U poređenju sa sirovim brašnom i glutenom, molekulske mase svih hidrolizata smanjene su na najviše 40 kDa. Subjedinice glutenina α -HMW-GS (83–88 kDa) i γ -HMW-GS (67–74 kDa) i ω 5-gliadina (49–55 kDa) su uklonjene enzimskom hidrolizom. Svi hidrolizati brašna, sa izuzetkom HB 5,0% (w/w), nemaju jasnu traku na 35 kDa. Svi hidrolizati su imali veliki broj polipeptida molekulskih masa manjih od 25 kDa. Možemo istaći da je u slučaju HB 15,0% (w/w) tokom procesa hidrolize (trake VIII, IX i X) sa povećanjem vrednosti stepena hidrolize primetan nastanak sve većeg broja polipeptida molekulske mase manje od 25 kDa. U poređenju sa trakama V i VI, traka VII nema jasno prisutne linije u opsegu molekulskih masa 15–25 kDa. Takođe, zabeležen je slabiji intenzitet traka u opsegu 25–40 kDa kod trake VII.



Slika 9.5.10. Elektroforetski profil proteinskih frakcija sirovog brašna i hidrolizata proteina brašna. Traka I – gluten, II i III – standard proteina, IV – sirovo brašno, V – HB 5% (w/w), VI – HB 10% (w/w), VII – HB 15% (w/w), VIII – HB 15% (w/w) – 15 min, IX – HB 15% (w/w) – 30 min, X – HB 15% (w/w) – 45 min.

9.5.2.3. Agregacione karakteristike hidrolizata proteina pšeničnog brašna

Raspodela veličina čestica sirovog pšeničnog brašna i hidrolizata proteina brašna (**Slika 9.5.11**) daje nam uvid u efekat koji ima enzimski tretman na proteine glutena. Prilikom raspodele veličina čestica sirovog pšeničnog brašna, najzastupljenije su čestice u opsegu veličina 200–400 nm. Enzimskom hidrolizom postignuta je efikasna promena veličina, pri čemu je došlo do pomeraja u profilu raspodele istih i pojavi novih pikova (**Slika 9.5.11a**). U slučaju hidrolizata primećena je pojava manjih čestica, opsega veličine srednjeg prečnika 10–100 nm. Takođe, čestice veličina 100–1000 nm su zabeležene. Za hidrolizate HB 10% (w/w) i HB 15% (w/w) – 15 min, zabeležena je pojava čestica velikih dimenzija srednjeg prečnika, oko ≈ 1000 nm. U profilu raspodele uzoraka hidrolizata pšeničnog brašna, koncentracije 15% (w/w), uočljive su čestice srednje veličine prečnika 1000 do 10000 nm, čiji udeo iako mali u ukupnom profilu nije zanemarljiv. Vrednosti zeta potencijala i polidisperznog indeksa, tj. mere uređenosti disperznih sistema, dati su u **Tabeli 9.6**. Vrednosti zeta potencijala su takođe zabeležene kao apsolutne vrednosti, u mV. Veće vrednosti Zeta potencijala upućuju na veću stabilnost čestica u vodenom rastvoru (**Chen & Zhang, 2006**). Za niske vrednosti Zeta potencijala vezuje se osobina agregacije i loša fizička stabilnost takvih disperznih sistema. Rezultati zabeleženi za hidrolizate brašna pokazuju da hidrolizati imaju lošu fizičku stabilnost i formiraju nestabilne vodene sisteme (**Slika 9.5.11b**).



Slika 9.5.11. a) Raspodela veličina čestica brašna (B) i hidrolizata proteina brašna (HB) i b) Zeta potencijal brašna (B) i hidrolizata proteina brašna (HB). Reakcioni uslovi hidrolize: Alkalaza, 5% E/S, pH 8,0, 60°C).

Nedovoljno veliko naelektrisanje na površini dispergovanih čestica sirovog brašna kao i hidrolizata proteina brašna bi dovelo do agregacije čestica. Za HB 5% (w/w) je zabeležena najveća apsolutna vrednost naelektrisanja ($-12,1 \pm 1,0$ mV) među hidrolizatima, i u poređenju sa netretiranim brašnom ($-13,3 \pm 0,36$ mV), nije zabeležena nikakva značajna razlika ($p > 0,05$). Najznačajnija promena u vrednosti Zeta potencijala zabeležena je kod uzorka HB 15% (w/w) ($0,187 \pm 0,34$ mV) sa vrednostima PdI 0,50. Možemo zaključiti da se postupkom enzimske hidrolize u slučaju prisustva različitog sadržaja suve materije značajno menja površinsko naelektrisanje u svim uzorcima u poređenju sa sirovim pšeničnim brašnom. S obzirom da ni jedan od tretiranih uzoraka nije imao apsolutno naelektrisanje veće od 20 mV, možemo zaključiti da se rastvori ovih hidrolizata mogu okarakterisati kao nestabilni.

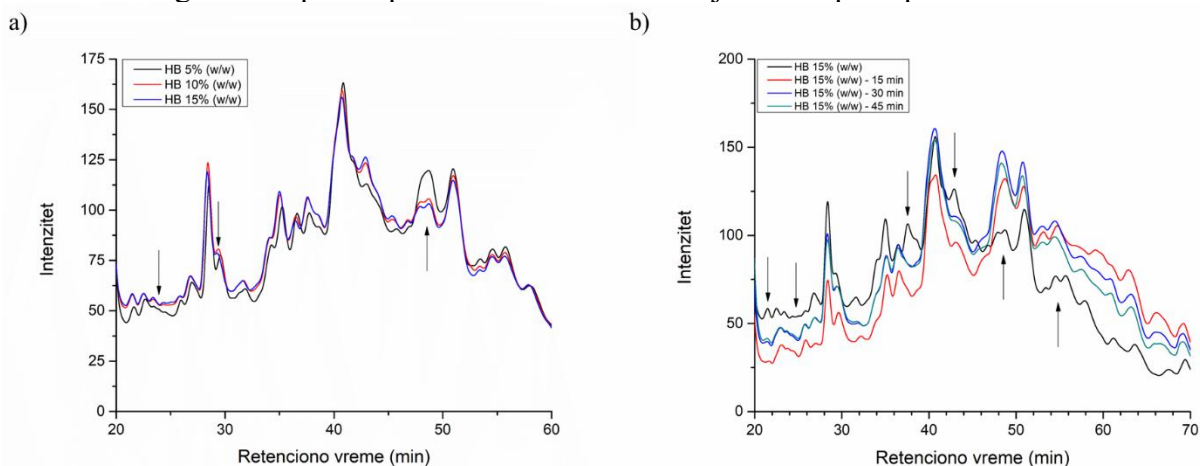
Tabela 9.6. Srednji prečnik čestica (d, nm) i koeficijenti raspodele (PdI) hidrolizata proteina brašna (Alkalaza, pH 8,0, T 60°C). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ($n=3$).

Uzorak	d, nm	PdI
Brašno	$1432,33 \pm 234,51$	$0,92 \pm 0,09$
HB 5% (w/w)	$125,71 \pm 42,46$	$0,46 \pm 0,11$
HB 10% (w/w)	$541,30 \pm 151,77$	$0,64 \pm 0,08$
HB 15% (w/w)	$167,37 \pm 1,71$	$0,50 \pm 0,00$
HB 15% (w/w) – 15 min	$234,77 \pm 26,77$	$0,92 \pm 0,08$
HB 15% (w/w) – 30 min	$144,97 \pm 5,56$	$0,48 \pm 0,03$
HB 15% (w/w) – 45 min	$179,93 \pm 2,78$	$0,51 \pm 0,00$

9.5.2.4. Profil peptida u hidrolizatima proteina brašna – RP-HPLC hromatografija

Hromatografski profili peptida pšeničnog brašna dobijenih hidrolizom pomoću Alkalaze su prikazani na Slici 9.5.12. Istaknute razlike na hromatogramima daju bliži uvid u mehanizam delovanja enzima na molekule proteinskih frakcija glutena iz brašna. Prisustvo skrobnih materija očigledno ima uticaj na sprečavanje formiranja glutenske mreže, čime se direktno ometa formiranje velikih proteinskih frakcija glutena, što olakšava pristup enzimu i sam postupak hidrolize. Poređenjem hromatograma na Slici 9.5.12a najveća razlika se uočava u manje polarnoj frakciji koja

izlazi između 45 i 50 min. Takođe, veća količina skrobnih materija olakšala je hidrolizu proteina glutena, što je u saglasnosti sa prethodno opisanim rezultatima koji se tiču ove serije eksperimenata. Kod uzorka HB 5% (w/w) se primećuje prisustvo jednog velikog pika, dok se kod preostala dva hidrolizata uočavaju dva manja pika. Razlika u pikovima između ova tri uzorka direktno je u korelaciji sa promenom hidrofobnosti proteinskih frakcija tokom postupka hidrolize. Među uzorcima HB 5–15 % (w/w) se teško dalje mogu uočiti razlike, pri čemu je ovaj rezultat u skladu sa prethodno dobijenim elektroforetskim profilima. U okviru uzorka HB 15 % (w/w) koji je pokazao najmanji sadržaj alergeni epitopa, detaljnije je ispitan uticaj prisutnog skroba na tok enzimske hidrolize. Na osnovu hromatograma prikazanih na **Slici 9.5.12b** možemo primetiti da endopeptidaza Alkalaza deluje na molekule proteinskih frakcija glutena tako što raskida veze između aminokiselina u peptidnim lancima i direktno utiče na polarnost nastalih polipeptida. S tim u vezi, sa povećanjem vremena hidrolize, od petnaestog minuta pa na dalje, uočava se smanjenje intenziteta prisustva polarnih polipeptida. Promenom polarnosti tokom vremena trajanja hidrolize i povećanjem intenziteta u nepolarnoj regiji hromatograma možemo pretpostaviti da zaista dolazi do raskidanja veza između aminokiselinskih parova na koje Alkalaza specifično deluje. Ovakve promene su u skladu sa promenama zabeleženim pomoću FTIR spektara, pa se na osnovu dobijenih rezultata ovih merenja može reći da je došlo do promene u sekundarnoj strukturi proteina glutena u hidrolizatima brašna. Delovanjem Alkalaze je uspešno izvršena modifikacija proteina glutena, pri čemu je zabeležen očigledan doprinos prisustva skrobnih materija tokom postupka hidrolize.

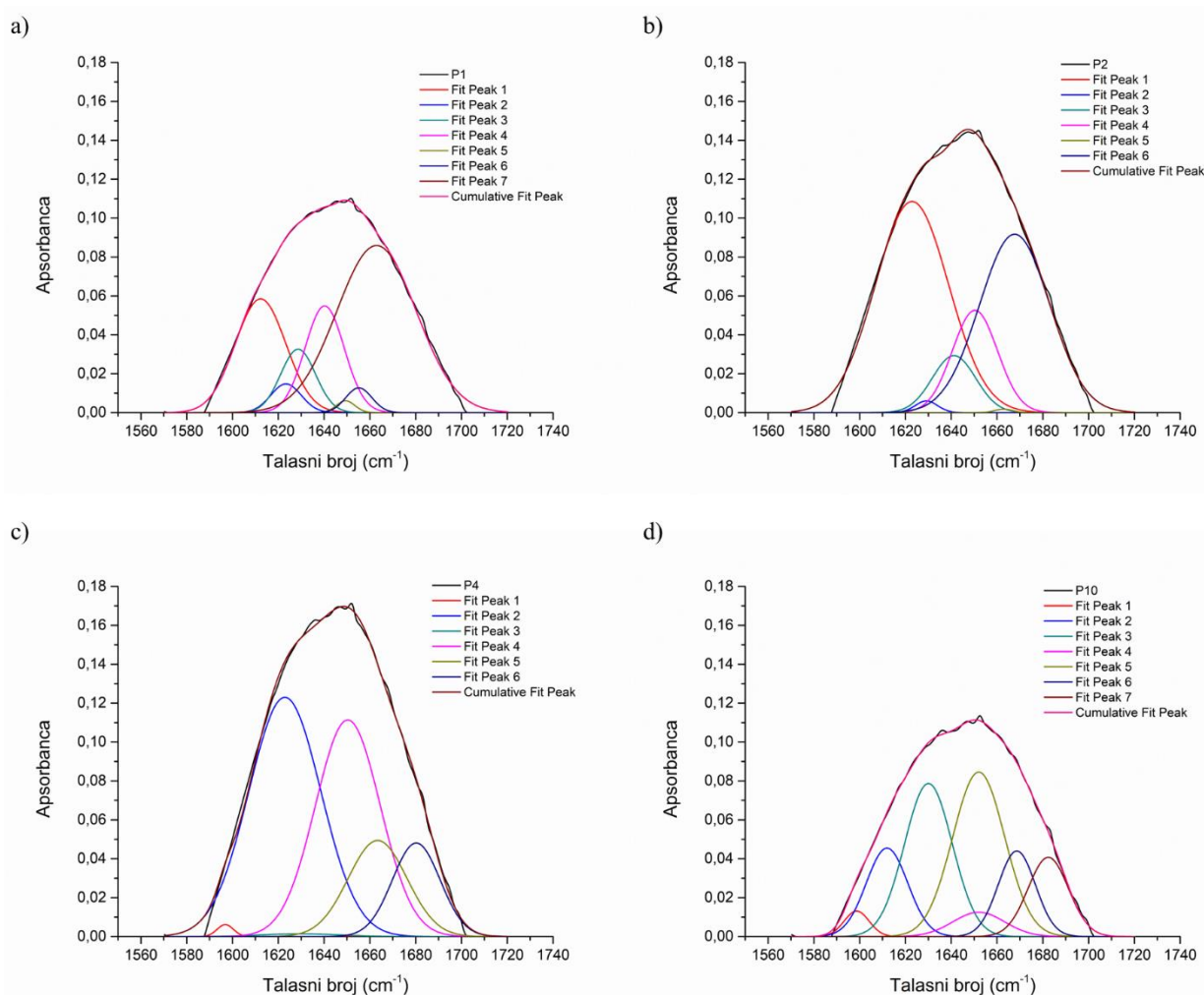


Slika 9.5.12. RP-HPLC hromatografski profili hidrolizata glutena iz brašna.

9.5.3. Strukturne promene u hidrolizatima glutena hidrolizovanih Pronazom

9.5.3.1. FTIR analiza

Dekonvolucijom izmerenih FTIR spektara bliže je određena sekundarna struktura dobijenih hidrolizata glutena pomoću Pronaze (**Slika 9.5.13**). U Amid I regiji ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) su detaljnije određene prisutne sekundarne strukture (**Tabela 9.7**). Najveće razlike uočene su u promeni sadržaja β -ploča, i to najveći procenat (21,17%) je prisutan kod hidrolizata sa najmanjom koncentracijom primenjenog enzima. Intermolekulske β -ploče takođe pokazuju razliku među dobijenim hidrolizatima, tako da je najveći procenat zabeležen kod uzorka P2. Povećana količina intramolekulskih β -ploča i odsustvo β -ploča kod uzorka P2 pokazuje da je Pronaza imala veći uticaj na promenu količine β -ploča u ovom uzorku. Najveća količina prisutnih α -heliksa zabeležena je u uzorku P1, dok je u uzorku P10 zabeležena očigledna reorganizacija nasumičnih jezgara u korist α -heliksa.



Slika 9.5.13. Dekonvolucija spektra amid I trake (1700–1600 cm^{-1}) FTIR spektra hidrolizata proteina glutena dobijenih pomoću enzima Pronaza (50 °C, pH 8).

Tabela 9.7. Sadržaj sekundarne strukture (%) hidrolizata glutena Pronazom.

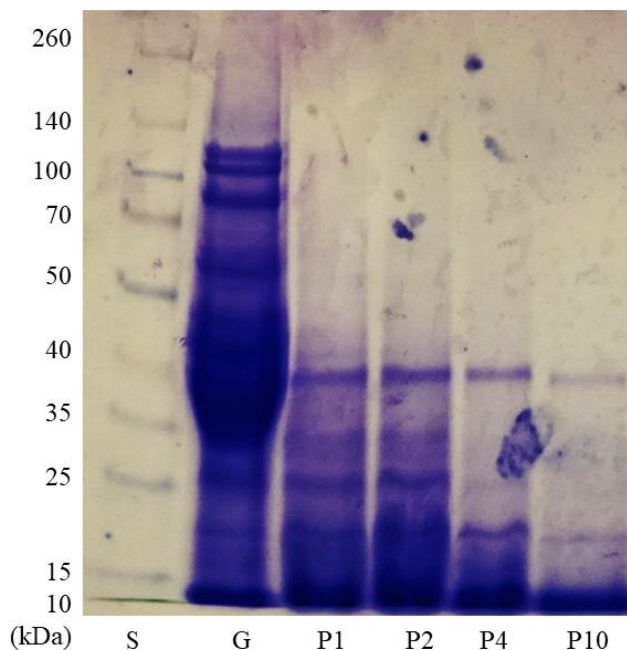
Sekundarna struktura	Sadržaj sekundarne strukture (%)			
	P1	P2	P4	P10
β -ploče (1605–1615 cm^{-1})	21,17	n.o.	0,46	15,47
β -ploče (intramolekulske**) (1615–1640 cm^{-1})	26,76	44,44	41,80	26,30
Nasumična jezgra*** (1640–1650 cm^{-1})	0,80	20,02	33,54	4,52
α -heliks (1650–1660 cm^{-1})	51,27	35,54	13,52	42,17
β -zavoji (1675–1690 cm^{-1})	n.o.*	n.o.*	10,68	11,55

*n.o. – nije određeno; ** paralelna i antiparalelna naborana β -ploča; ***zajedno umotane 2-6- α spirale.

9.5.3.2. SDS-PAGE elektroforeza

Primenom SDS-PAGE je detaljnije ispitano dejstvo Pronaze na gluten. Na osnovu elektroforetskog profila (Slika 9.5.14) zabeleženo je da Pronaza efikasno hidrolizuje velike proteinske subjedinice glutena, pri čemu je kod svih ispitanih hidrolizata zabeleženo potpuno odsustvo proteinskih frakcija molekulskih masa većih od 40 kDa. Hidroliza Pronazom od ~5% je bila dovoljna da ukloni velike subjedinice glutena, tačnije da ih skрати na više polipeptida manjih molekulskih masa. Sa porastom količine primenjenog enzima primetno je smanjenje broja prisutnih proteinskih frakcija. U slučaju sva 4 hidrolizata zabeleženo je konstantno prisustvo frakcija 35–40

kDa, koje odgovaraju LMW-GS i ω -1,2-gliadinima (32–39 i 39–44 kDa, respektivno). Na osnovu ovih elektroforetskih profila možemo zaključiti da Pronaza nije bila u potpunosti efikasna u uklanjanju/degradaciji ponavljajućih alergeni epitopa (**Tabela 3.2**). Pronaza je bila efikasna u uklanjanju frakcija α -HMW-GS (83–88 kDa), γ -HMW-GS (67–74 kDa) i ω 5-gliadina (49–55 kDa). Najefikasnijom se pokazala najveća koncentracija enzima, što je u skladu sa postignutim stepenom hidrolize kao i izmerenom vrednošću za alergenicost. Pronaza nije imala značajnije dejstvo na frakcije proteina glutena manje od ~20 kDa. Poređenjem sa ostalim elektroforetskim profilima dobijenim hidrolizom glutena i proteina brašna pomoću Alkalaze (**Slika 8.5.3** i **Slika 8.5.10**), pokazano je da Pronaza ima dobar učinak u uklanjanju frakcija glutena 15–40 kDa, i to je najbolje pokazano kod uzorka P10. U uzorku P10 zabeleženo je odsustvo navedenih frakcija, što je manje nego kod ostalih uzoraka tretiranih ovim enzimom.

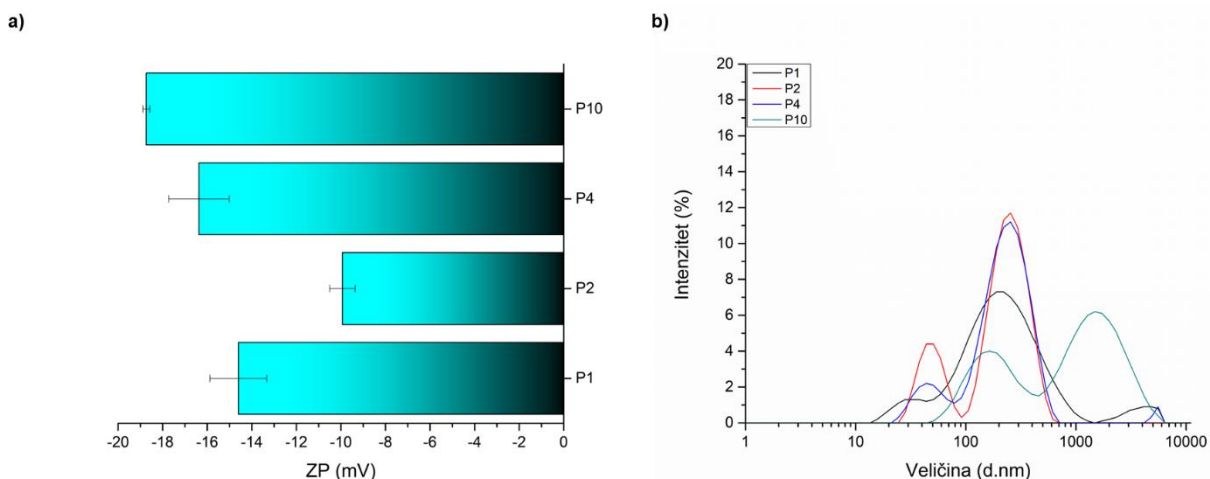


Slika 9.5.14. Elektroforetski profil hidrolizata glutena enzimom Pronaza. S– standardi, G – gluten, P 1–10 – hidrolizati Pronazom.

9.5.3.3. Agregacione karakteristike glutena nakon modifikacije Pronazom

Izmerena naelektrisanja hidrolizata glutena dobijenih pomoću Pronaze prikazani su na **Slici 9.5.15a**. Najveću apsolutnu vrednost naelektrisanja i najmanje odstupanje u vrednostima pokazao je uzorak P10, $-18,73 \pm 0,15$ mV. Po vrednostima ga prate uzorci P4 i P1, dok hidrolizat P2 pokazuje najmanju vrednost naelektrisanja u datim uslovima merenja, $-9,93 \pm 0,57$ mV. Za uzorak P10 možemo reći da u datim uslovima formira relativno stabilne vodene sisteme, dok se uzorak P2 može smatrati nepogodnim za formiranje stabilnih vodenih sistema.

Raspodela veličina čestica dobijenih hidrolizata Pronazom prikazana je na **Slici 9.5.15b**. U uzorku P10 primećuje se prisustvo velikih frakcija, u regiji 1000–10000 nm, što je dodatno potvrđeno velikom vrednošću koeficijenta raspodele PdI od $0,934 \pm 0,10$ (**Tabela 9.8**). Kod uzoraka P1–4 zabeležene su idealne vrednosti polidisperznih indeksa od približno 0,5 PdI. U poređenju sa hidrolizatima dobijenih primenom enzima Alkalaze (mikrotalasno pretretiranim uzorcima i kontrolnom hidrolizom), možemo zaključiti da hidrolizati dobijeni Pronazom pokazuju manju stabilnost u formiranju vodenih rastvora. Vrednosti srednjeg prečnika čestica hidrolizata dobijenih pomoću Pronaze znatno su niže u poređenju sa hidrolizatima dobijenih pomoću Alkalaze.



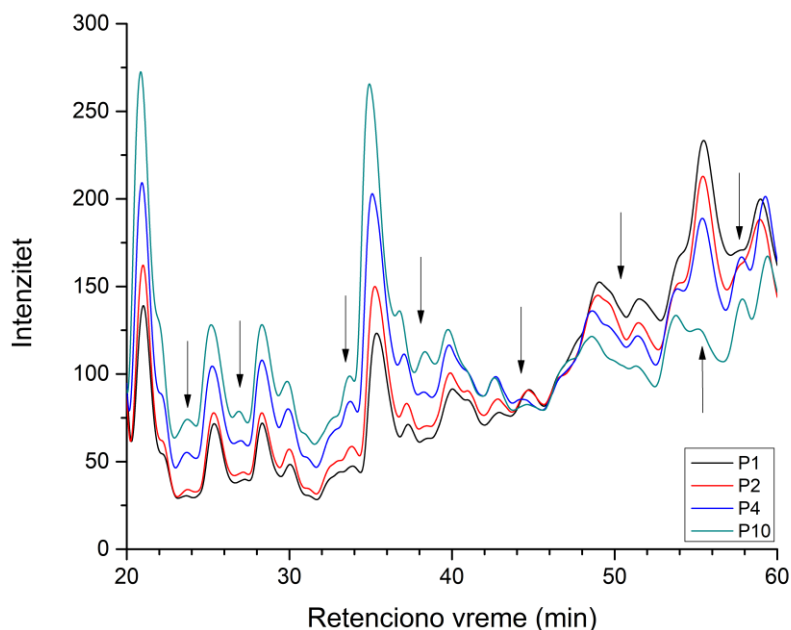
Slika 9.5.15. a) Zeta potencijal hidrolizata glutena Pronazom i b) raspodela veličina čestica hidrolizata glutena Pronazom.

Tabela 9.8. Srednje Z-vrednosti veličine i koeficijenti raspodele hidrolizata glutena Pronazom. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ($n=3$).

Uzorak	d , nm	PdI
P1	$146,43 \pm 1,88$	$0,507 \pm 0,01$
P2	$140,03 \pm 4,29$	$0,505 \pm 0,02$
P4	$163,13 \pm 2,87$	$0,454 \pm 0,02$
P10	$341,77 \pm 12,59$	$0,934 \pm 0,10$

9.5.3.4. RP-HPLC profil hidrolizata glutena

Hidrolizati glutena pomoću Pronaze pokazali su donekle ujednačene profile polipeptida na prikazanim hromatogramima (Slika 9.5.16). Naime, hromatogrami pokazuju identične profile u regiji polarnih frakcija, dok do značajnijih razlika u profilu i intenzitetima dolazi tek po registrovanju nepolarnih frakcija. Nakon 45 min dolazi do značajne promene u intenzitetima prisutnih frakcija. Kod uzoraka P1, P2 i P4 zabeleženi su identični pikovi različitog intenziteta u regiji nepolarnih frakcija. Uzorak P10 je pokazao smanjen intenzitet nepolarnih frakcija. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da veća koncentracija unetog enzima prouzrokuje raskidanje većeg broja peptidnih veza što se vidi na osnovu većeg postignutog stepena hidrolize (oko 12%). Moguće je da se raskidaju i peptidne veze između hidrofobnih aminokiselina i da se hidrofobni regioni na površini molekula na taj način razbijaju usled čega se smanjuje udeo hidrofobnih frakcija. Sveukupno veća koncentracija enzima deluje povoljno na promenu strukture peptida glutena i na smanjenje alergnog potencijala. Kao i kod prethodnih uzoraka glutena, smanjenje alergnosti je ispraćeno i promenom sadržaja polarnih i nepolarnih grupa, u skladu sa količinom prisutnog enzima i vremenom enzimske hidrolize.



Slika 9.5.16. RP-HPLC hromatografski profili hidrolizata glutena Pronazom.

9.6. Antioksidativna i funkcionalna svojstva proteinskih frakcija glutena modifikovanih enzimskim postupcima i mikrotalasnim tretmanom

9.6.1. Antioksidativna i funkcionalna svojstva glutena modifikovanog enzimskom hidrolizom sa Alkalazom i mikrotalasinim preretmanom

Uticaj kontrolisanog mikrotalasnog preretmana na antioksidativna i funkcionalna svojstva glutena hidrolizovanog Alkalazom ispitan je različitim metodama. S obzirom da su proteinske frakcije glutena odgovorne za formiranje stabilne strukture i mreže unutar prehrambenih proizvoda, nakon ispitivanja uticaja mikrotalasnog preretmana na strukturne promene, dostupnosti peptidnih veza za dejstvo biokatalizatora i količine alergeni epitopa, bilo je potrebno ispitati da li sinergistički uticaj mikrotalasa i enzimске hidrolize utiče na tehnološko-funkcionalna i antioksidativna svojstva dobijenih hidrolizata. Stoga su ispitani indeksi emulgujuće aktivnosti (EAI) i emulzione stabilnosti (ESI), za netretirani gluten, kontrolni (**GK**) i mikrotalasin hidrolizat (**GHMT**). Rezultati su prikazani u **Tabeli 9.9**. Rezultati su pokazali da je u zavisnosti od odabranog procesa i uslova mikrotalasnog preretmana, enzimska hidroliza povoljno delovala na antioksidativna i funkcionalna svojstva glutena. Najznačajnije poboljšanje ($p < 0,05$) u vrednosti EAI je postignuto za mikrotalasin preretirani uzorak, nakon 135 min hidrolize, kom je izmerena vrednost EAI od $50,66 \pm 3,10 \text{ m}^2/\text{g}$, u poređenju sa netretiranim glutenom ($11,63 \pm 1,10 \text{ m}^2/\text{g}$) i kontrolnom hidrolizom nakon 90 min (**GK** 90, $36,19 \pm 0,008 \text{ m}^2/\text{g}$). Međutim, sa produženjem vremena hidrolize primećen je pad u vrednosti EAI, što je u skladu sa dostupnim literaturnim podacima za potpuno hidrolizovane proteine ([Kong, Zhou, & Qian, 2007](#); [Elmalimadi, et al., 2017b](#)). Prema literaturnim podacima, kontrolisane hidrolize biljnih proteina doprinose poboljšanju emulgujućih svojstava pogodnih za dalju primenu u prehrambenim proizvodima ([Wang, Li, Li, & Selomulya, 2022](#)). Čini se da manji polipeptidi formiraju slabije omotače oko uljanih kapljica, čime se postižu niže vrednosti EAI. Ekstenzivnom hidrolizom glutena, čime su proizvedeni manji polipeptidi, postignuto je da na kraju hidrolize kontrolni (**GK**) i mikrotalasin preretirani hidrolizat (**GHMT**) imaju vrednosti EAI od $25,63 \pm 2,85 \text{ m}^2/\text{g}$ i $22,05 \pm 3,60 \text{ m}^2/\text{g}$, respektivno. S druge strane, ESI vrednosti su se povećavale sa povećanjem postignutih stepena hidrolize u poređenju sa netretiranim glutenom, i najveća promena je zabeležena kod potpuno hidrolizovanog kontrolnog uzorka (**GK**) glutena, $3,30 \pm 0,31 \text{ h}$. Možemo pretpostaviti

da je Alkalaza hidrolizovala proteine na takav način da pokazuje visoku specifičnost prema peptidnim vezama bogatim hidrofobnim aminokiselinama. Usled sve veće izloženosti ostataka hidrofobnih aminokiselina na površinama molekula, zabeležena je veća sposobnost hidrolizata glutena da formiraju stabilne emulzije.

Tabela 9.9. Indeksi emulgujuće aktivnosti (EAI) i emulzione stabilnosti (ESI), kapacitet (FC) i stabilnost (FS) pene za netretirani gluten, kontrolni i mikrotalasni hidrolizat.

Uzorak	EAI, m ² /g	ESI, h	FC, %	FS, %
Gluten	11,63 ± 1,10 ^f	0,33 ± 0,04 ^e	50,93 ± 6,55 ^{ab}	48,91 ± 5,13 ^a
GK 45	41,02 ± 2,96 ^b	1,64 ± 0,85 ^{bc}	60,67 ± 1,41^a	55,05 ± 4,43^a
GK 90	36,19 ± 0,08 ^b	1,22 ± 0,47 ^{cde}	54,04 ± 0,48 ^{ab}	41,27 ± 4,49 ^a
GK 135	29,29 ± 0,80 ^c	2,51 ± 0,46 ^{ab}	53,09 ± 0,51 ^{ab}	38,37 ± 1,64 ^a
GK	25,63 ± 2,85 ^{ce}	3,30 ± 0,31^a	47,06 ± 9,31 ^{ab}	11,11 ± 7,86 ^b
GHMT 45	27,59 ± 1,12 ^{cd}	3,06 ± 0,42^a	60,93 ± 3,26^a	53,32 ± 0,54 ^a
GHMT 90	27,50 ± 0,95 ^{cd}	1,32 ± 0,11 ^{be}	56,47 ± 1,29 ^{ab}	42,76 ± 8,73 ^a
GHMT 135	50,66 ± 3,10^a	1,10 ± 0,27 ^{cde}	59,50 ± 5,05 ^a	53,70 ± 2,62^a
GHMT	22,05 ± 3,60 ^{de}	1,64 ± 0,30 ^{bd}	41,65 ± 1,70 ^b	10,56 ± 2,74 ^b

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima u istoj koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Glavni preduslovi da se protein smatra dobrim agansom za formiranje pene jeste postojanje mogućnosti da bude brzo adsorbovan tokom procesa formiranja mehurića na granici faza gas-tečnost, da brzo može da prođe kroz konformacionu promenu i da dođe do reorganizacije funkcionalnih grupa na pristupnom mestu i da ima sposobnost da formira kohezivne viskoelastične filmove kroz intermolekulske interakcije. Primena hidrolizata glutena trenutno je našla svoje mesto u proizvodnji proizvoda koji zahtevaju formiranje pene. S obzirom da su se hidrolizati glutena pokazali kao dobri stabilizatori pene, mogu se primeniti u postupku proizvodnje kremova, čokolade, mučenih mlečnih proizvoda i piva (Asrarkulova & Bulushova, 2018). Jedna od glavnih primena hidrolizata glutena, a koja se oslanja na njihova svojstva penjenja, jeste zamena jaja u proizvodnji pena čime se smanjuje sadržaj holesterola i mogućnost zaražavanja salmonelom. Unapređen kvalitet krema zabeležen je kada su proteini iz jaja zamenjeni hidrolizatom glutena (Joye & McClements, 2014).

Stoga pripremljenim hidrolizatima poreklom od netretiranog i mikrotalasno pretretiranog glutena, su ispitane sposobnosti formiranja kohezivne i stabilne pene. U Tabeli 9.9 su prikazani rezultati ovih merenja. Očigledno je da hidrolizati pripremljeni postupkom enzimske hidrolize pomoću Alkalaze, naročito oni sa nižim procentom postignutog stepena hidrolize, su pokazali najveći kapacitet za formiranje pene. Ova karakteristika je primetna naročito nakon 45 min hidrolize, i postignutim stepenima hidrolize od ~17%. Ovo opažanje važi u oba slučaja pripremljenih hidrolizata, i kod hidrolizata nepretretiranog glutena (60,67 ± 1,41%) i hidrolizata mikrotalasno pretretiranog glutena (60,93 ± 3,26%). Nastavak procesa hidrolize je doveo do statistički značajnog ($p < 0,05$) pada u sposobnosti formiranja stabilne pene, u slučaju oba hidrolizata. Mikrotalasni tretman je doveo do izmenjenog dejstva Alkalaze i specifičnosti supstrata, čime je prouzrokovan neznatno bolji kapacitet formiranja pene. Dakle, mikrotalasni pretretman je imao veći uticaj na parcijalnu agregaciju proteinskih frakcija glutena koji su naknadno hidrolizovani Alkalazom. Pritom, tokom hidrolize je došlo do formiranja peptida manjih molekulskih masa, sa manjim naelektrisanjem i većom površinskom hidrofobnošću, i kao takvi ovi hidrolizati su se pokazali idealnima za formiranje pene većeg kapaciteta i stabilnosti, u poređenju sa netretiranim glutenom. Drugim rečima, usled strukturnih promena u proteinima glutena prouzrokovanih dejstvom mikrotalasa i naknadnom enzimskom hidrolizom Alkalazom, koje se ogledaju u sadržaju SH grupa i strukturnih promena zabeleženih FTIR analizama, oni zauzimaju takvu konformaciju da dozvoljavaju smanjenje napona na granici između tečne i gasovite faze. Formirane pene su pokazale visoku stabilnost tokom 30 min, gde je za kontrolnu

hidrolizu (GK) izmerena stabilnost od $55,05 \pm 4,43\%$, a za mikrotalasno pretretirani hidrolizat $53,32 \pm 0,54\%$. U radu Jalcina (Yalcin) i saradnika (Yalcin, Sakiyan, Sumnu, Celik, & Koksel, 2008) pokazano je da su vrednosti za emulgujuća svojstva i kapacitet formiranja pene i njihove stabilnosti, mikrotalasno zagrevanih uzoraka, bile veće nego u slučaju kontrolnog uzorka, što je u skladu sa rezultatima dobijenim tokom ovog istraživanja. Do istog zaključka su došli naučnici u jednoj ranijoj studiji koja se ticala uticaja Alkalaze na hidrolizu termalno tretiranog glutena i posledično na funkcionalna svojstva (Elmalimadi, et al., 2017b). U svakom slučaju, promene indukovane mikrotalasnim tretmanom je u ovom slučaju teško dalje analizirati i diskutovati s obzirom na to da mikrotalasni uređaji sa preciznom kontrolom temperature i snage nisu korišćeni u navedenim literaturnim radovima.

Za komercijalno dostupne proteaze (Pepsin, Tripsin, Alkalaza, Neutraza) postoje podaci koji se odnose na proizvodnju hidrolizata proteina sa antioksidativnim svojstvima (Qian, Jung, & Kim, 2008; Chalamaiah, Jyothirmayi, Diwan, & Dinesh Kumar, 2015; Karami, Peighambardoust, Hesari, Akbari-Adergani, & Andreu, 2019; Hu, et al., 2022). U cilju ispitivanja potencijalnih zdravstvenih benefita hidrolizata glutena, ispitane su antioksidativne aktivnosti. Stoga je ispitana sposobnost neutralisanja slobodnih ABTS^{•+} i DPPH radikala, kao i heliranja jona metala, *in vitro* testovima.

U slučaju neutralisanja ABTS^{•+} radikala, zabeležen je porast aktivnosti kod hidrolizata glutena, u poređenju sa netretiranim glutenom (kontrola). Ovi rezultati prikazani su u **Tabeli 9.10**. Prikazani rezultati ukazuju na to da dobijeni hidrolizati glutena, kako netretiranih proteina, tako i tretiranih mikrotalasima, poseduju izuzetne sposobnosti doniranja protona nestabilnom radikalskom katjonu. Nije zabeležena statistički značajna razlika u ABTS aktivnosti između mikrotalasno pretretiranih hidrolizata i kontrolnog hidrolizata. Za mikrotalasno pretretirani hidrolizat je zabeležena vrednost ABTS aktivnosti od $70,29 \pm 1,09\%$. Svi uzorci hidrolizata uzimani nakon 45, 90 i 135 min nisu pokazali značajnu razliku u vrednosti ABTS aktivnosti. Možemo zaključiti da se nakon 45 min hidrolize (kontrolne (GK) ili mikrotalasno pretretirane (GHMT)) dostiže plato vrednosti u ABTS aktivnosti. U poređenju sa sirovim glutenom, IC_{50} vrednosti za sve hidrolizate su statistički značajno smanjene ($p < 0,05$). Ovi rezultati prikazani su u **Tabeli 9.11**. S obzirom na to da mikrotalasni pretretman nije podstakao proizvodnju peptida sa statistički značajnom promenom u vrednosti antioksidativne aktivnosti, možemo zaključiti da mikrotalasni tretman nema uticaja na unapređenje proizvodnje peptida sa povećanim afinitetom prema slobodnim radikalima. Takođe, iako nije došlo do značajnih izmena u antioksidativnoj aktivnosti u slučaju mikrotalasno pretretiranih hidrolizata, značajno je istaći da nije došlo ni do njihovog uništavanja.

Tabela 9.10. Antioksidativne aktivnosti ABTS (%), MICA (%) i DPPH (%) sirovog glutena, hidrolizovanog glutena i mikrotalasno pretretiranog i hidrolizovanog glutena.

Uzorak	ABTS, %	MICA, %	DPPH, %
Gluten	$7,52 \pm 0,22^b$	n.o.*	n.o.*
GK45	$66,86 \pm 0,88^a$	$91,24 \pm 0,51^c$	$40,60 \pm 4,96^a$
GK90	$69,27 \pm 0,66^a$	$93,44 \pm 0,71^b$	$37,86 \pm 5,20^a$
GK135	$67,45 \pm 0,15^a$	$94,24 \pm 0,05^{ab}$	$37,01 \pm 2,30^a$
GK	$69,93 \pm 1,02^a$	$94,57 \pm 0,09^b$	$41,24 \pm 2,84^a$
GHMT45	$66,50 \pm 0,51^a$	$90,12 \pm 0,40^c$	$40,04 \pm 3,20^a$
GHMT90	$69,56 \pm 0,51^a$	$94,75 \pm 0,05^{ab}$	$40,42 \pm 0,60^a$
GHMT135	$68,69 \pm 0,51^a$	$94,80 \pm 0,47^{ab}$	$45,47 \pm 0,96^a$
GHMT	$70,29 \pm 1,09^a$	$96,00 \pm 0,11^a$	$48,11 \pm 0,86^a$

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (n=3). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima u istoj koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$). n.o.* – nije određeno.

U literaturi se navodi da *in vitro* rezultati antioksidativne aktivnosti mereni kao sposobnost neutralizacije ABTS radikalskog katjona mogu odstupati od merenja vođenih u biološkim uslovima, *in vivo*. Međutim merenje sposobnosti neutralizacije radikalskih katjona daje uvid u antioksidativni mehanizam delovanja ispitivane supstance čime se mogu obezbediti određene predikcije za delovanje u biološkom okruženju. S tim u vezi, u literaturi je istaknuto da antioksidativna aktivnost ne zavisi direktno od porasta stepena hidrolize i da su nosioci aktivnosti specifične sekvence aminokiselina (Wiryaphan, Chitsomboon, & Yongsawadigul, 2012). U literaturi se navodi da ključnu ulogu u antioksidativnoj aktivnosti hidrolizata imaju peptidi koji u sebi sadrže hidrofobne (Pro, Leu, Ala, Trp, Phe, Met, Phe) i hidrofilne (Tyr, Cys, His) aminokiselinske R-bočne ostatke (Mendis, Rajapakse, & Kim, 2005; Dávalos, Miguel, Bartolomé, & López-Fandiño, 2004; Chen, Muramoto, Yamauchi, & Nokihara, 1996; Zhang, et al., 2018). Interesantan podatak je da je hidrotermalnim tretmanom pšeničnih mekinja na temperaturama u rasponu 130–160 °C moguće proizvesti hidrolizate koji ispoljavaju sposobnost neutralizacije ABTS^{•+} i DPPH[•] radikala, pri čemu je povećanje aktivnosti uz porast temperature objašnjeno dodatnim otpuštanjem fenolnih jedinjenja. Za ova jedinjenja je poznato da ispoljavaju antioksidativna, antimikrobna i antikancerogena svojstva (Cingöz, Akpınar, & Sayaslan, 2023). Najveća vrednost stepena neutralizacije DPPH[•] radikala zabeležena je za mikrotalasno pretretirani uzorak, 48,11 ± 0,86%. Povećanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala je u direktnoj korelaciji sa postignutim stepenom hidrolize, što je u skladu sa dostupnim literaturnim podacima za hidrolizate proteina biljnog porekla (Elmalimadi, et al., 2017b). Ovaj rezultat je u skladu sa merenjima za aktivnosti zasnovanim na neutralizaciji ABTS^{•+}.

Poređenjem svih dobijenih vrednosti nije zabeležena statistički značajna razlika između DPPH aktivnosti uzoraka. Dalje, poređenjem *IC*₅₀ vrednosti (mg/ml) možemo istaći da je za mikrotalasno pretretirani uzorak zabeležena najniža vrednost minimalne inhibitorne koncentracije proteina potrebne za neutralizaciju 50% radikala, i to u vrednosti od 4,44 ± 0,086 mg/ml. Ovaj rezultat se statistički značajno razlikuje od ostalih, stoga možemo zaključiti da mikrotalasni pretretman ima pozitivan uticaj na proizvodnju peptida sa većim afinitetom prema slobodnim radikalima, tj sa sposobnošću doniranja elektrona i/ili protona. Poređenja radi, primena ultrazvuka za hidrolizu glutena pomoću Alkalaze je imala povoljan uticaj na proizvodnju hidrolizata glutena sa unapređenim antioksidativnim aktivnostima, pri čemu se posebno istakla metal-jon healtna aktivnost (Zhu, Su, Guo, Peng, & Zhou, 2011). Karami i sar. u svom radu su se bavili proizvodnjom hidrolizata glutena primenom Pepsina i Alkalaze. U njihovoj studiji hidrolizati Pepsina su pokazali neznatno više DPPH i ABTS aktivnosti u poređenju sa hidrolizatima dobijenim pomoću Alkalaze. Međutim, u istoj studiji zabeleženo je da je heirajuća aktivnost prema jonima Fe²⁺ takođe zavisna od unete koncentracije hidrolizata (0,5–5 mg/ml), pri čemu su hidrolizati dobijeni pomoću Alkalaze ispoljili metal-jon helatnu aktivnost u opsegu 25–49%. Za ove hidrolizate je zabeleženo antioksidativno dejstvo i antitumorsko dejstvo, čime se otvara mogućnost primene ovih hidrolizata u proizvodnji različitih nutraceutika i funkcionalne hrane sa farmakološkog nivoa.

Na osnovu podataka iz drugih studija zaključeno je da antioksidativna aktivnost hidrolizata glutena u velikoj meri zavisi od korišćenog enzima, izvora proteina, reakcionih uslova (Karami, Peighambaroust, Hesari, Akbari-Adergani, & Andreu, 2019). Joni metala u svom prelaznom obliku (Fe²⁺) mogu učestvovati u reakcijama oksidacije. Ukoliko ostanu slobodni, ovakvi joni metala mogu dovesti do Haber–Vajs (izvorno Haber–Weiss) reakcije tokom koje se formira štetan i veoma reaktivan hidroksil radikal. Slobodni Fe²⁺ joni ukoliko dođu u kontakt sa H₂O₂ mogu potencijalno dovesti do Fentonove reakcije u kojoj se Fe²⁺ prevodi u Fe³⁺, što dalje može dovesti do ubrzanog oksidativnog oštećenja ćelijskih komponenata (Huang, Ou, & Prior, 2005; Kehrer, 2000; Lee, Koo, & Min, 2004). Metal-jon helatne aktivnosti hidrolizata su ispitane primenom jona metala Fe²⁺. Metal-jon helatna aktivnost sirovog pšeničnog glutena (kontrola) nije mogla biti određena. Međutim, zabeležena je značajna razlika u vrednostima poređenjem netretiranih i mikrotalasno pretretiranih hidrolizata. Najveća vrednost MICA aktivnosti zabeležena je u slučaju mikrotalasno pretretiranog hidrolizata (96,00 ± 0,11%), čime je potvrđeno da je mikrotalasni pretretman doveo do unapređenja proizvodnje peptida sa metal-jon helatnom sposobnošću. Izmerene *IC*₅₀ vrednosti (mg/ml) za MICA aktivnost, date su u **Tabeli 9.11**. Prilikom proizvodnje hidrolizata soje, zabeleženo je da najvišu

metal-jon helatnu aktivnost ispoljava frakcija od 5–10 kDa, dok su slični podaci objavljeni i za hidrolizate proteina uljane repice. Visoke aktivnosti ovih hidrolizata pripisane su prisustvu aminokiselina Glu i Asp. IC_{50} vrednosti koje su bile u opsegu 0,29–0,70 mg/ml su bile znatno niže nego kod nekih drugih hidrolizata (konoplje, uljane repice) (Zhang, et al., 2018).

Poređenjem svih vrednosti hidrolizata glutena uočeno je da su vrednosti IC_{50} za krajnji kontrolni hidrolizat i mikrotalasno pretretirani hidrolizat statistički značajno različiti u odnosu na sve ostale, međutim između ta dva uzorka nema značajne razlike. Interesantno je istaći da se aminokiselina histidin smatra dobrim helirajućim agensom usled prisustva imidazolovog prstena. Smanjenjem dostupnih slobodnih jona Fe^{2+} sprečava se nastanak hidroksil radikala. Rezultati istraživanja su pokazali da prisustvo aromatičnog prstena u određenim peptidnim frakcijama direktno utiče na povećanu metal-jon helatnu aktivnost (Pownall, Udenigwe, & Aluko, 2010). Kisele (Asp i Glu) i bazne (Lys) aminokiseline imaju važnu ulogu u procesu heliranja jona metala preko svojih karboksilnih i amino grupa na bočnim lancima (Rajapakse, Mendis, Byun, & Kim, 2005).

Tabela 9.11. IC_{50} (mg/ml) vrednosti antioksidativne aktivnosti ABTS (%), MICA (%) i DPPH (%) sirovog glutena, hidrolizovanog glutena i mikrotalasno pretretiranog i hidrolizovanog glutena.

Uzorak	IC_{50} , mg/ml		
	ABTS	MICA	DPPH
Gluten	63,12 ± 20,85 ^b	n.o.*	n.o.*
GK45	1,10 ± 0,17 ^a	1,07 ± 0,00 ^{ab}	5,87 ± 0,727 ^{ab}
GK90	1,22 ± 0,02 ^a	0,84 ± 0,05 ^{cd}	5,91 ± 0,564 ^{ab}
GK135	1,11 ± 0,19 ^a	0,81 ± 0,01 ^{cd}	6,15 ± 0,089 ^a
GK	1,08 ± 0,15 ^a	0,74 ± 0,03 ^d	5,38 ± 0,205 ^{ab}
GHMT45	1,06 ± 0,11 ^a	1,20 ± 0,09 ^a	5,82 ± 0,502 ^{ab}
GHMT90	1,04 ± 0,14 ^a	0,84 ± 0,01 ^{cd}	5,52 ± 0,127 ^{ab}
GHMT135	0,96 ± 0,06 ^a	0,92 ± 0,01 ^{bc}	4,55 ± 0,004 ^{bc}
GHMT	1,03 ± 0,17 ^a	0,75 ± 0,02 ^d	4,44 ± 0,086 ^{bc}

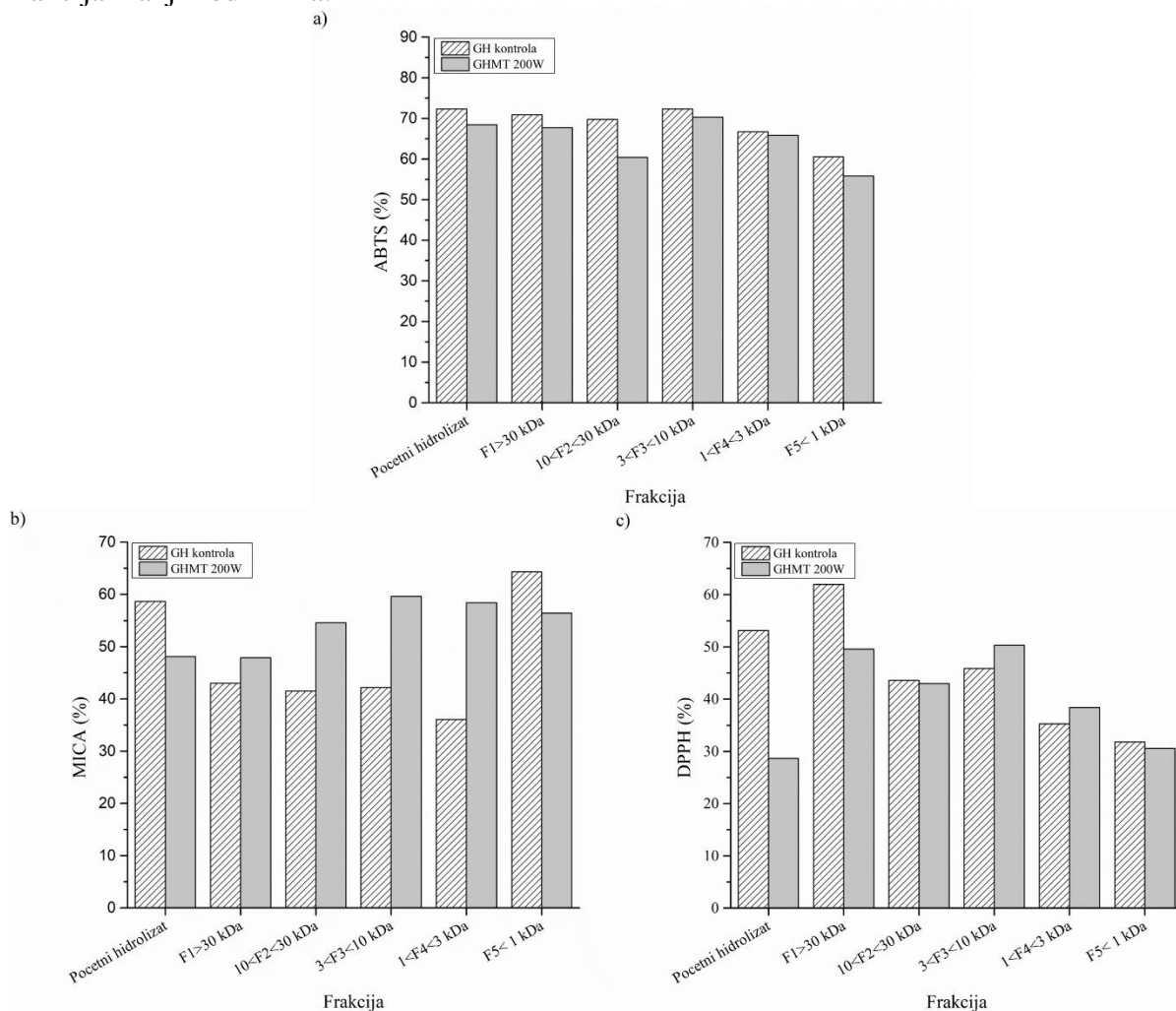
Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($n=3$). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima u istoj koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$). n.o.* – nije određeno.

9.6.1.1. Antioksidativna svojstva frakcija hidrolizata glutena dobijenih ultrafiltracijom

U cilju detaljnijeg ispitivanja uticaja mikrotalasnog pretretmana na tok hidrolize glutena pomoću Alkalaze i proizvodnju bioaktivnih peptida, primenom ultrafiltracije pomoću celuloznih membrana različite veličine pora, razdvojeni su peptidi tačno profilisanih molekulskih masa. Primenom postupka ultrafiltracije pomoću celuloznih membrana sa veličinama pora u opsegu 1–30 kDa moguće je izvršiti višestepenu separaciju hidrolizata peptida glutena u cilju izdvajanja onih sa najvišim potencijalom za antioksidativnu i metal-jon helatnu aktivnost. Svakoj frakciji razdvojenih peptida određene su sposobnosti neutralisanja $ABTS^{\cdot+}$ radikalskog katjona i $DPPH^{\cdot}$ radikala kao i sposobnost heliranja jona Fe^{2+} , primenom odgovarajućih razblaženja, kako bi se detaljnije utvrdile razlike među dobijenim frakcijama hidrolizata (Slika 9.6.1a). Na osnovu prikazanih rezultata, možemo primetiti da mikrotalasni pretretman dovodi do različite raspodele molekulskih masa, tačnije da nema pravilne raspodele u proizvodnji različitih frakcija peptida. Ovakva raspodela među frakcijama posledično utiče i na sama biološka svojstva hidrolizata. Prilikom merenja antioksidativne aktivnosti pomoću ABTS metode, nisu primećene značajne razlike među frakcijama hidrolizata, pri čemu su netretirani uzorci pokazali nešto viši stepen aktivnosti. Ovako izjednačene aktivnosti sposobnosti neutralisanja $ABTS^{\cdot+}$ radikala, su u skladu sa prethodno izmerenim vrednostima (Tabela 9.10). U literaturi je zabeleženo da hidrolizat kukuruznog glutenskog brašna dobijen pomoću Neutrase ispoljava izuzetne antioksidativne sposobnosti. Frakcionisanjem tog hidrolizata je

ustanovljeno da frakcija veličine 3–5 kDa ispoljava odličan antioksidativni potencijal (određen pomoću ABTS, DPPH i MICA metoda). Osim mogućnosti da obezbedi bolju stabilnost proizvoda, za frakciju ovog hidrolizata je ustanovljeno da se može efikasno primeniti u formulacijama za sprečavanje rasta HepG2 ćelija hepatokarcinoma bez toksičnih posledica (Hu, et al., 2022).

Najveće razlike među uzorcima zabeležene su prilikom merenja metal-jon helatne aktivnosti (Slika 9.6.1b). Na osnovu postignutih rezultata možemo zaključiti da su kod mikrotalasno pretretiranih uzoraka glavni nosioci helatne aktivnosti frakcije F2 (10–30 kDa), F3 (3–10 kDa) i F4 (1–3 kDa), pri čemu dominantnu ulogu ima frakcija F3. Za razliku od mikrotalasno pretretiranog hidrolizata, kontrolni hidrolizat pokazuje da je glavni nosilac helatne aktivnosti frakcija F5 (< 1 kDa). Mikrotalasno pretretirani uzorci, tačnije frakcije F2–F4, pokazuju 10–25% veće aktivnosti u poređenju sa istim frakcijama kod hidrolizata bez pretretmana. Hidrolizati kukuruznog glutenskog brašna dobijeni pomoću papaina, ficina i bromelaina su pokazali da u slučaju sva tri tipa hidrolizata, frakcije srednje molekulske mase (3–5 i 5–10 kDa) ispoljavaju najviše vrednosti helatne aktivnosti prema jonu Fe²⁺ (Hu, Chen, & Li, 2020). Rezultati dobijeni tokom izrade ove doktorske disertacije su u korelaciji sa rezultatima ovog i drugih istraživanja (Jovanović, et al., 2016b; Hu, Chen, & Li, 2020; Wang, Li, Li, & Selomulya, 2022). Na osnovu podataka dobijenih ovim merenjem možemo zaključiti da je mikrotalasni pretretman pogodan za proizvodnju peptida manjih molekulskih masa sa povećanom metal-jon helatnom aktivnošću, usmerenom ka jonima Fe²⁺. Mikrotalasni pretretman ima direktan uticaj na tok hidrolize, što se može primetiti u pravilnom trendu porasta MICA aktivnosti sa smanjenjem molekulske mase peptida. Za razliku od ovoga, netretirani hidrolizat pokazuje opadajući trend aktivnosti sa smanjenjem molekulske mase, pri čemu je zabeleženo odstupanje u aktivnosti kod frakcija manjih od 1 kDa.



Slika 9.6.1. Antioksidativne aktivnosti frakcija hidrolizata glutena i mikrotalasno pretretiranog (200 W) hidrolizata glutena: a) ABTS (%), b) MICA (%) i d) DPPH (%).

U istraživanju Tanga i sar. (Tang, Peng, Zhen, & Chen, 2009) zabeležene su visoke vrednosti stepena neutralizacije DPPH radikala (50–75%) u hidrolizatima heljde kao i u slučaju hidrolizata kukuruznog glutenskog brašna (Li, Han, & Chen, 2008). Prema literaturnim podacima, biljni peptidi manjih molekulskih masa ispoljavaju bolje antioksidativne aktivnosti u slučaju proteina kukuruza, soje, pirinča, konoplje, pšeničnih mekinja i pšenice, čija semenki (Zhang, et al., 2018; Hu, Chen, & Li, 2020; Wen, Zhang, Zhang, Duan, & Ma, 2020; Wang, Li, Li, & Selomulya, 2022). Merenje DPPH antioksidativne aktivnosti hidrolizata pokazalo je da mikrotalasni pretretman nema preterano povoljan uticaj na hidrolizat glutena. U slučaju velikih molekulskih masa, konkretno frakcija F1, kontrolni hidrolizat bez pretretmana (GK) je pokazao veće vrednosti DPPH aktivnosti u odnosu na mikrotalasno pretretirani uzorak (Slika 9.6.1c). Dalje se razlika između mikrotalasno tretiranog i netretiranog hidrolizata pokazuje tek nakon analize frakcija F3 i F4. U ovim frakcijama je mikrotalasno pretretirani uzorak pokazao veći procenat DPPH aktivnosti, pri čemu su rezultati merenja za frakcije F2–F4 u sinergiji sa rezultatima MICA aktivnosti istog hidrolizata. Možemo zaključiti da su postupkom ultrafiltracije uspešno pokazane razlike i prednosti mikrotalasno pretretiranog hidrolizata u odnosu na netretirani uzorak. Iako među uzorcima nije bilo značajne statističke razlike (Tabela 9.10), među frakcijama uzoraka istih molekulskih masa zabeležena su odstupanja, i to više u korist mikrotalasnog pretretmana. Ovime se potvrđuje delotvornost mikrotalasnog tretmana u postupku proizvodnje bioaktivnih peptida sa smanjenim alergenim svojstvima jer je naknadnim postupkom ultrafiltracije moguće dodatno razdvojiti frakcije hidrolizata glutena i obezbediti peptide sa visokim antioksidativnim aktivnostima. Samim tim se mogu izdvojiti manji peptidi sa redukovanim alergenim svojstvima i poboljšanim antioksidativnim i helirajućim aktivnostima.

9.6.2. Antioksidativna i funkcionalna svojstva hidrolizata proteina brašna

Proizvodnjom hidrolizata proteina brašna sa smanjenim alergenim svojstvima dolazi i do smanjenja dužine peptidnih lanaca. U ovom delu disertacije ispitano je da li su tehnološko-funkcionalna svojstva glutena unapređena i/ili očuvana. S obzirom da stepen hidrolize predstavlja jedan od važnijih parametara prilikom proizvodnje bilo kakvog specifičnog hidrolizata, on je takođe i u korelaciji sa svim tehnološko-funkcionalnim svojstvima koji prate proces. U cilju formiranja emulzija potrebno je primeniti snažan proces mešanja kako bi se veće uljane kapljice dispergovale na one manje veličine čime se povećava kontaktna površina između faza ulje–voda (Dickinson, 2009). Indeksi emulgujuće aktivnosti (EAI, m^2/g) i emulzione stabilnosti (ESI, h) za hidrolizate proteina brašna (HB) i kontrolu (brašno) su prikazani u Tabeli 9.12. EAI i ESI vrednosti sirovog pšeničnog brašna pokazale su niske vrednosti, 20,09 m^2/g i 0,56 h, respektivno. Tretiranjem sirovog pšeničnog brašna Alkalazom, vrednosti EAI su značajno unapređene ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnim pšeničnim brašnom. Izmerene EAI vrednosti hidrolizata HB 10,0% (w/w) i HB 15,0% (w/w) su $129,58 \pm 18,10$ i $120,94 \pm 10,74$ m^2/g , respektivno. Na osnovu značajno unapređene vrednosti EAI možemo zaključiti da je dovoljna količina hidrolizata adsorbovana na površini uljanih kapljica, čime je sprečeno ponovno formiranje velikih uljanih kapi spajanjem više malih susednih uljanih kapljica. Vrednosti indeksa emulzione stabilnosti (ESI) su u manjoj meri unapređene procesom hidrolize, ali ne značajno ($p > 0,05$). Najveća vrednost ESI je izmerena za HB 5,0% (w/w), 0,91 h. Zabeleženo je da su vrednosti za EAI i ESI povećane nakon postupka enzimske hidrolize. Poboljšanje ovih svojstava je u skladu sa dostupnim podacima prethodnih istraživanja (Deng, et al., 2016; Elmalimadi, et al., 2017a).

Pene na bazi proteina predstavljaju disperzije gasa u vodenoj fazi prekrivene tankim slojem proteina koji su polarnom stranom orijentisani prema vodenoj fazi. Proteini imaju amfifilna svojstva koja im omogućavaju da absorbuju na granici faza gas-tečnost, čime se smanjuje površinski napon (Wouters, et al., 2018). U zavisnosti od dužine peptidnih lanaca, hidrolizati koji su bogati polipeptidnim lancima imaju veliki potencijal da budu dobar agens za formiranje pene. Stoga,

kapacitet penjenja (*FC*, %) i stabilnost pene (*FS*, %) su mereni za kontrolno meko pšenično brašno i sve hidrolizate proteina brašna, a rezultati su tabelarno prikazani u **Tabeli 9.12**.

Kontrolno pšenično brašno je pokazalo najviše vrednosti *FC* i *FS*, $21,52 \pm 2,4\%$ i $10,00 \pm 1,51\%$, respektivno. Hidrolizati proteina brašna su pokazali smanjenje u vrednostima kapaciteta i stabilnosti pene u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Najniža vrednost kapaciteta penjenja izmerena je u slučaju HB 10,0% (w/w), $18,54 \pm 4,08\%$. Vrednost za stabilnost pene istog uzorka je bila $7,45 \pm 4,65\%$. Kapacitet penjenja hidrolizata HB 15,0% (w/w) je izmerena $22,44 \pm 5,86\%$. U ovom slučaju nije zabeleženo značajno smanjenje vrednosti za *FC* i *FS* u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Uzorak pripreman kao HB 15,0% (w/w) je dalje podvrgnut dodatnim analizama, pri čemu su uzorci uzimani nakon 15, 30 i 45 min enzimske hidrolize kako bi se ispitala promena ovih svojstava kroz vreme. Sva tri uzorka uzeta nakon navedenih vremena su pokazala značajan porast u vrednosti kapaciteta penjenja u poređenju sa kontrolnim uzorkom i u potpunosti hidrolizovanim uzorcima. Vrednosti za stabilnost penjenja su generalno pratila opadajući trend tokom hidrolize, međutim u slučaju uzorka hidrolizata uzetog nakon 15 min zabeležen je značajan porast u vrednosti stabilnosti pene ($44,31 \pm 0,69\%$). Uopšteno, produženo vreme hidrolize Alkalazom dovodi neosporno do povećanja u vrednosti stepena hidrolize, a samim tim i do proizvodnje peptida manjih molekulskih masa. Ovakva promena u dužinama peptidnih lanaca stoga dovodi do pojave lošijih svojstava penjenja u analiziranim hidrolizatima. Svojstva koja utiču direktno na formiranje pene i njenu stabilnost direktno zavise od samog stepena hidrolize i veličine nastalih peptida (Lassissi, Hettiarachchy, Rayaprolu, Kannan, & Davis, 2014) stoga nehidrolizovani proteini u sirovom uzorku pokazuju bolja svojstva kapaciteta penjenja i stabilnosti pene u poređenju sa kompletno hidrolizovanim proteinima brašna.

Tabela 9.12. Indeksi emulgujuće aktivnosti (EAI) i emulzione stabilnosti (ESI), kapacitet (FC) i stabilnost (FS) pene sirovog brašna i hidrolizata proteina brašna (Alkalaza, pH 8,0, T 60°C).

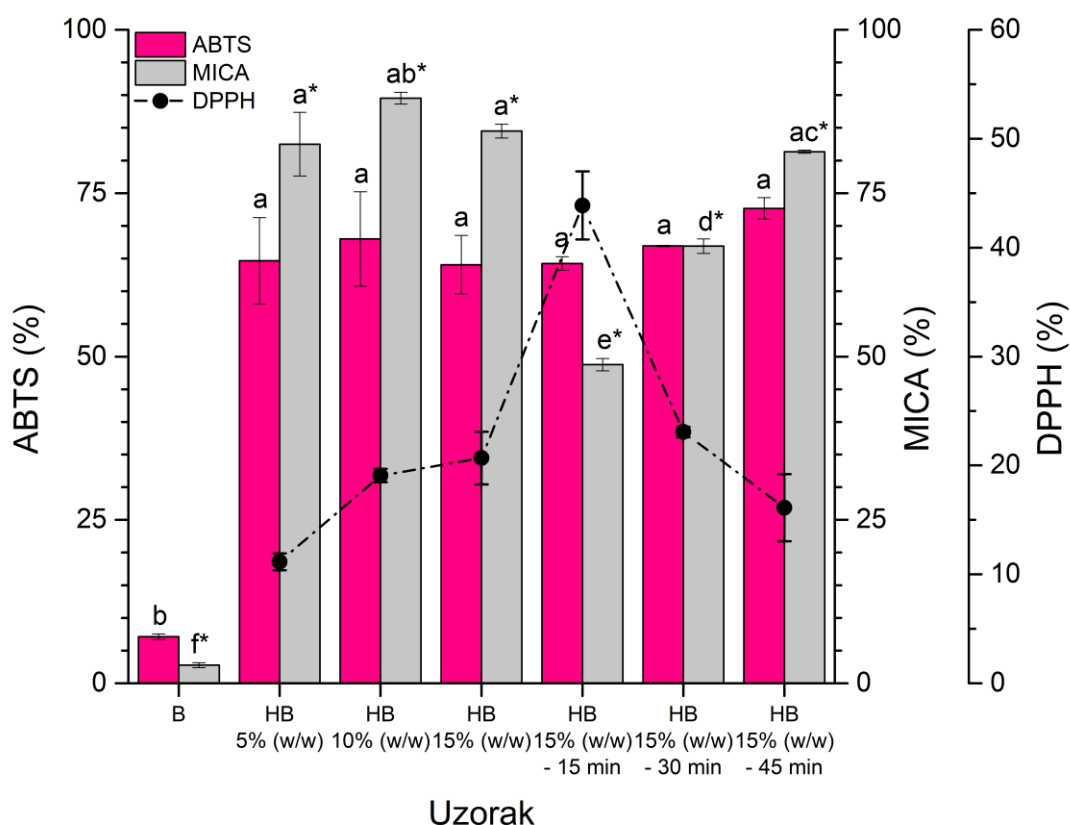
<i>Uzorak</i>	<i>EAI, m²/g</i>	<i>ESI, h</i>	<i>FC, %</i>	<i>FS, %</i>
Brašno	$20,09 \pm 4,35^b$	$0,56 \pm 0,28^a$	$21,52 \pm 2,40^b$	$10,00 \pm 1,51^{cd}$
HB 5% (w/w)	$104,85 \pm 21,36^a$	$0,91 \pm 0,43^a$	$19,25 \pm 5,56^b$	$7,45 \pm 4,65^d$
HB 10% (w/w)	$129,58 \pm 18,10^a$	$0,86 \pm 0,21^a$	$18,54 \pm 4,08^b$	$6,71 \pm 2,07^d$
HB 15% (w/w)	$120,94 \pm 10,74^a$	$0,90 \pm 0,41^a$	$22,44 \pm 5,86^b$	$5,56 \pm 4,05^d$
HB 15% (w/w) – 15 min	$127,03 \pm 2,86^a$	$0,60 \pm 0,12^a$	$53,39 \pm 0,17^a$	$44,31 \pm 0,69^a$
HB 15% (w/w) – 30 min	$130,05 \pm 3,82^a$	$0,61 \pm 0,02^a$	$46,26 \pm 3,93^a$	$33,32 \pm 5,07^{ab}$
HB 15% (w/w) – 45 min	$128,74 \pm 3,15^a$	$0,72 \pm 0,09^a$	$52,26 \pm 2,54^a$	$22,09 \pm 6,41^{bc}$

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ($n=3$). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima u istoj koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Hidrolizatima proteina brašna su dalje ispitana antioksidativna svojstva i to metodama koje ispituju sposobnost neutralisanja slobodnih radikala i heliranja jona metala. Cilj kompletne hidrolize jeste bio da se obezbedi maksimalno smanjenje alergenosti uzorka, kao i krajnjeg hidrolizata sa potencijalno visokom antioksidativnom aktivnošću. Sposobnost neutralisanja slobodnih ABTS^{•+} radikala dobijenih hidrolizata prikazana je na **Slici 9.6.2**. Svi proizvedeni hidrolizati proteina brašna su pokazali statistički značajno veće vrednosti ($p < 0,05$) sposobnosti neutralisanja slobodnih ABTS^{•+} radikala u poređenju sa kontrolnim nehidrolizovanim brašnom. Ovo je pokazatelj da hidrolizati proteina brašna u sebi sadrže bioaktivne peptide koji se ponašaju kao donori elektrona i mogu da reaguju sa slobodnim radikalima kako bi ih preveli u stabilniji oblik i time zasutavili lanac radikalskih reakcija. Nehidrolizovani proteini brašna pokazuju veoma niske vrednosti neutralisanja slobodnih ABTS^{•+} radikala, $7,12 \pm 0,30\%$. Primenom komercijalno dostupne proteaze bezbedne za upotrebu u prehrambenim proizvodima, uspešno je povećana antioksidativna aktivnost proteina brašna u hidrolizatima, do čak $72,67 \pm 1,16\%$, zabeleženo u slučaju hidrolizata HB 15,0% (w/w) nakon 45 min. Svi hidrolizati su pokazali visoku antioksidativnu aktivnost ($> 60\%$) nezavisno od vremena trajanja hidrolize i značajno unapređenje u poređenju sa kontrolnim uzorkom ($p < 0,05$).

Svim uzorcima je izmerena i polovina maksimalne inhibitorne aktivnosti (IC_{50} , mg/ml) i rezultati ovih merenja prikazani su u **Tabeli 9.13**. Ovi rezultati su u skladu sa procentualnim vrednostima izmerene aktivnosti neutralizacije ABTS^{•+} radikala svih hidrolizata. Izmerene vrednosti neutralizacije DPPH prikazane su na **Slici 9.6.2**. Najveća vrednost zabeležena je u slučaju hidrolizata brašna HB 15,0% (w/w) nakon 15 min hidrolize, $43,88 \pm 7,12\%$, i ona je statistički značajna ($p < 0,05$). Možemo zaključiti da najveću sposobnost da donira atom vodonika ima upravo hidrolizat brašna nakon 15 min, čime se može stabilizovati/neutralisati reaktivni radikal i obezbediti zaustavljanje lančane radikalske reakcije (Pazinatto, Gomes Malta, Pastore, & Netto, 2013).

Uočen je opadajući trend u vrednosti sposobnosti neutralizacije DPPH radikala sa porastom stepena hidrolize, što ukazuje na to da manji peptidi imaju manju sposobnost neutralizacije DPPH radikala. Izmerene vrednosti DPPH za polovinu maksimalne inhibitorne aktivnosti (IC_{50} , mg/ml) pokazale su da nema statistički značajne razlike između uzoraka. Sposobnost neutralizacije DPPH radikala se nalazi u većim peptidnim lancima, dok je najveća vrednost među krajnjim hidrolizatima zabeležena u slučaju HB 15,0% (w/w), $20,68 \pm 2,41\%$. Direktna povezanost između antioksidativnih aktivnosti izraženih preko sposobnosti neutralisanja slobodnih radikala i heliranja metalnih jona je poznata i najčešće se ova dva parametra zajedno prate kako bi se bolje razumeo mehanizam delovanja potencijalno pripremljenog antioksidansa (**Slika 9.6.2**). Iako DPPH radikal nije biološki relevantan radikal, s obzirom da se rastvara u metanolu, i dalje ima široku primenu u određivanju potencijalnih antioksidativnih aktivnosti proteina i njihovih derivata prirodnog porekla (Pownall, Udenigwe, & Aluko, 2010).



Slika 9.6.2. Antioksidativne aktivnosti ABTS (%), MICA (%) i DPPH (%) sirovog brašna i hidrolizata proteina brašna (Alkalaza, pH 8,0, T 60°C). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ($n=3$). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima u istoj koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Metal helatna aktivnost ispraćena je smanjenjem intenziteta obojenja kompleksa koji nastaje u reakciji između jona Fe^{2+} i ferozina, pri čemu dobijeni bioaktivni peptidi glutena heliraju Fe^{2+} jone i time sprečavaju formiranje kompleksa sa ferozinom. Pri koncentraciji od 1,8 mg/ml hidrolizati proteina brašna su pokazali značajan porast u vrednosti heliranja Fe^{2+} jona (MICA) u poređenju sa kontrolnim uzorkom (brašno). Svi potpuno hidrolizovani uzorci su pokazali aktivnost >80%, dok su uzorci hidrolizata uzimani nakon 15, 30 i 45 min pokazali porast MICA vrednosti tokom vremena hidrolize. Najveća vrednost helirajuće aktivnosti je zabeležena u slučaju HB 10,0% (w/w), $89,53 \pm 0,63\%$. Prema trenutno dostupnim literaturnim podacima, sa porastom vrednosti stepena hidrolize, beleži se bolja metal-jon helatna aktivnost (Jamdar, et al., 2010). U poređenju sa kontrolnim uzorkom, svi ispitani uzorci hidrolizata pokazuju značajan porast vrednosti ($p < 0,05$) metal-jon helatne aktivnosti. Polovina maksimalne inhibitorne koncentracije (IC_{50} , mg/ml) svih uzoraka hidrolizata pokazuju značajno poboljšanje u izmerenoj vrednosti u poređenju sa kontrolnim uzorkom (brašno), čiji rezultati su prikazani u Tabeli 9.13. U cilju poređenja sa literaturnim podacima, IC_{50} vrednosti (mg/ml) helirajuće aktivnosti hidrolizata proteina semena drveta božura hidrolizovanih Alkalazom, Neutrazom i papainom su bile u opsegu 0,99–1,18 mg/ml, pri čemu su te vrednosti niže u poređenju sa hidrolizatima proteina uljane repice i membrane ljuske jajeta. U istraživanju Vanga (Wang) i saradnika je pokazano da među odabranim hidrolitičkim enzimima Alkalaza pokazuje najveći potencijal ka proizvodnji hidrolizata sa unapređenim helirajućim potencijalom (Wang, et al., 2021). Na osnovu izloženih podataka, upotreba Alkalaze se ispostavlja kao opravdana usled proizvodnje hidrolizata smanjene alergnosti i evidentno unapređenih antioksidativnih svojstava.

Tabela 9.13. IC_{50} (mg/ml) vrednosti antioksidativne aktivnosti ABTS (%), MICA (%) i DPPH (%) sirovog brašna i hidrolizata proteina brašna (Alkalaza, pH 8,0, T 60°C).

Uzorak	IC_{50} , mg/ml		
	ABTS	MICA	DPPH
Brašno	$40,04 \pm 4,02^a$	n.o.*	n.o.*
HB 5% (w/w)	$1,60 \pm 0,11^b$	$1,07 \pm 0,00^{ab}$	$9,25 \pm 0,073^a$
HB 10% (w/w)	$1,72 \pm 0,14^b$	$0,84 \pm 0,05^{cd}$	$8,76 \pm 0,050^a$
HB 15% (w/w)	$2,19 \pm 0,22^b$	$0,81 \pm 0,01^{cd}$	$7,78 \pm 1,957^a$
HB 15% (w/w) – 15 min	$2,66 \pm 0,27^b$	$0,74 \pm 0,03^d$	$4,26 \pm 1,934^a$
HB 15% (w/w) – 30 min	$2,24 \pm 0,14^b$	$1,20 \pm 0,09^a$	$5,49 \pm 1,205^a$
HB 15% (w/w) – 45 min	$1,85 \pm 0,40^b$	$0,84 \pm 0,01^{cd}$	$7,22 \pm 1,274^a$

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (n=3). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima u istoj koloni su statistički značajno različite ($p < 0,05$). n.o.* – nije određeno.

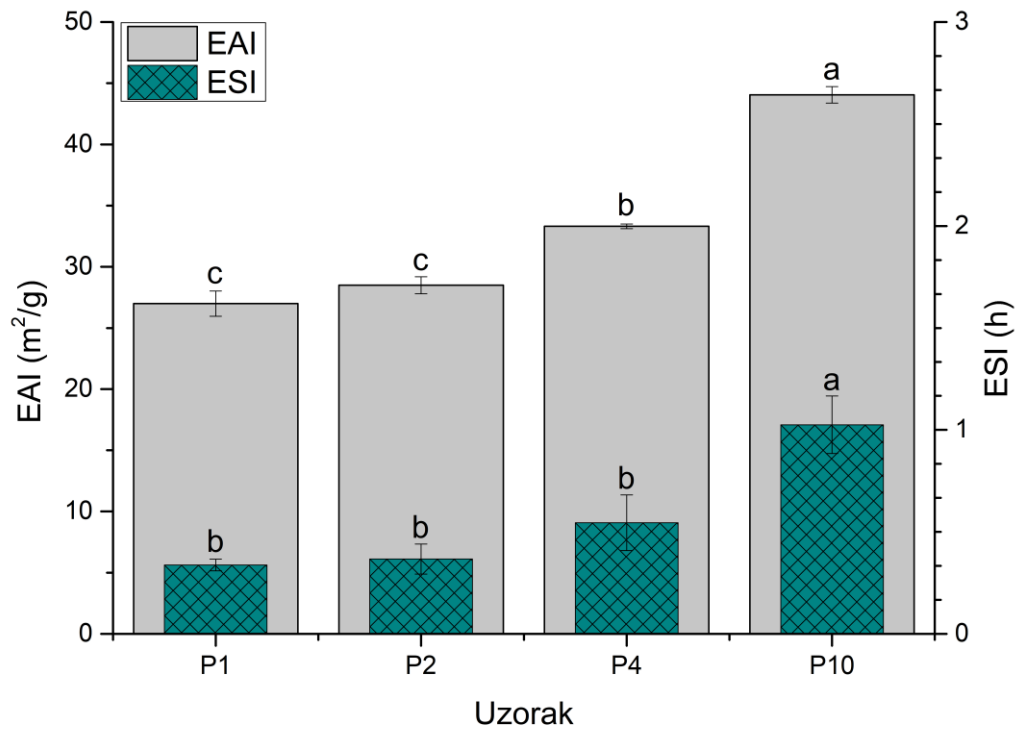
Primećeno je da hidrolizati glutena proizvedeni postupkom enzimske hidrolize pokazuju veće vrednosti metal-jon helatne aktivnosti (%) u poređenju sa ABTS aktivnošću (%). Među svim ispitanim hidrolizatima dobijenih pomoću Alkalaze, najveću sposobnost heliranja jona metala pokazali su uzorci pripremljeni kao HB 10,0% (w/w), a nakon njih HB 5,0% i 15,0%. Iako nijedan od pripremljena tri hidrolizata ne pokazuje jaku sposobnost neutralisanja slobodnih $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikala, ispoljavaju značajno visoku sposobnost heliranja jona metala, u ovom slučaju jone Fe^{2+} . Sa druge strane hidrolizat pripremljen kao HB 5,0% (w/w), uprkos nižem stepenu hidrolize u poređenju sa HB 10,0% i 15,0% (w/w), pokazao je identičnu sposobnost neutralisanja slobodnih $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikala. Isti uzorak u slučaju heliranja jona Fe^{2+} se pokazao lošijim, pri čemu je pokazano da svaki antioksidativni test drugačije opisuje antioksidativnu aktivnost. Ove uočene razlike se mogu javiti usled različitih mehanizama delovanja primenom $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikala i heliranja metala. Takođe, razlika u selektivnosti i reaktivnosti između jona metala i $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikala, hemijskog sastava propratnih rastvora korišćenih tokom analiza i hemijska struktura peptida antioksidanasa (dužina njihovih lanaca, orijentacija, prisutni ostaci aminokiselina) mogu direktno uticati na ishod merenja. Kao što je

prikazano na **Slici 9.6.2**, sa porastom vremena trajanja hidrolize i sa povećanjem postignutog stepena hidrolize, sposobnost hidrolizata da heliraju jone metala se povećava. Naime, može se reći da se količina heliranih jona gvožđa povećava linearno sa porastom sadržaja slobodnih karboksilnih i amino grupa, koje nastaju kao posledica delovanja endopeptidaze Alkalaze i raskidanja unutrašnjih peptidnih veza na određenim položajima aminokiselina (histidin, aspartat, glutamat). Proces heliranja jona metala u njihovom prelaznom obliku je važan jer se time sprečavaju dalje reakcije lipidne peroksidacije. Opšte je poznato da na starenje organizma utiče više faktora, način života, ishrana, uslovi životne sredine, međutim glavni uzrok starenja je povezan sa reaktivnim kiseoničnim vrstama i slobodnim radikalima. Iako je kiseonik jedan od ključnih komponenata za funkcionisanje organizma, neki njegovi oblici mogu imati štetan efekat na zdravlje. Superoksid anjon i vodonik peroksid nisu glavni reaktivni oblici kiseonika, međutim, direktno posreduju formiranju hidroksil radikala. Reaktivni oblici kiseonika mogu izazvati lipidnu oksidaciju, oksidaciju proteina, a posrednici su i u izazivanju mnogih malignih oboljenja. Joni metala u svom prelaznom obliku učestvuju u iniciranju i propagaciji same lipidne oksidacije. Sama reakcija je zavisna od prisustva jona metala, što znači da ukoliko bioaktivnom komponentom uspešno vežemo jone metala u svom prelaznom obliku, direktno sprečavamo formiranje hidroksil radikala. Na ovaj način se može uticati na smanjenje oksidativnog stresa u organizmu. Konzumiranjem hrane koja prirodno u sebi sadrži nutraceutike kao i suplemenata proizvedenih modifikacijom hrane možemo uneti balans i dodatno obezbediti zaštitu našem organizmu od štetnih uticaja (Lee, Koo, & Min, 2004). Na kraju, možemo pretpostaviti da hidrolizati proteina brašna pokazuju veću specifičnost prema jonima metala, naspram neutralisanja slobodnog ABTS radikalskog katjona. Stoga, pripremljeni hidrolizati, tačnije njihovi slobodni ostaci aminokiselina imaju veću sposobnost da učestvuju u elektrostatičkim interakcijama nego da doniraju elektron.

U istraživanju koje su sprovedeli Kong i sar. različiti biljni proteini (proteini zrna soje, proteini oraha, proteini glutena) su hidrolizovani pomoću Alkalaze. U toj studiji, hidrolizati glutena (frakcija rastvorna u etanolu) su pokazali najveći kapacitet za vezivanje jona gvožđa (108,54 mg/g) u poređenju sa ostalim hidrolizatima proteina (Kong, et al., 2021). Primenom izoelektričnog autofokusiranja na enzimski hidrolizat glutena, Park i sar. su izdvojili frakcije koje ispoljavaju veće sposobnosti heliranja jona Fe^{2+} u poređenju sa čistim hidrolizatom, kada se koriste kao dodatak prilikom pravljenja mesnih ćufti. Nasuprot ovome, čist hidrolizat je imao bolju aktivnost prilikom uklanjanja slobodnih radikala od izdvojenih frakcija (Park, Imazu, Matsumura, Nakamura, & Sato, 2012). U prehrambenoj industriji, masti i ulja koja se nalaze u proizvodu su izložena riziku od oksidacije. Primenom hidrolizata u formulacijama hrane može se sprečiti oksidacija masti tako što bi peptidi reagovali sa slobodnim radikalima (Asrarkulova & Bulushova, 2018).

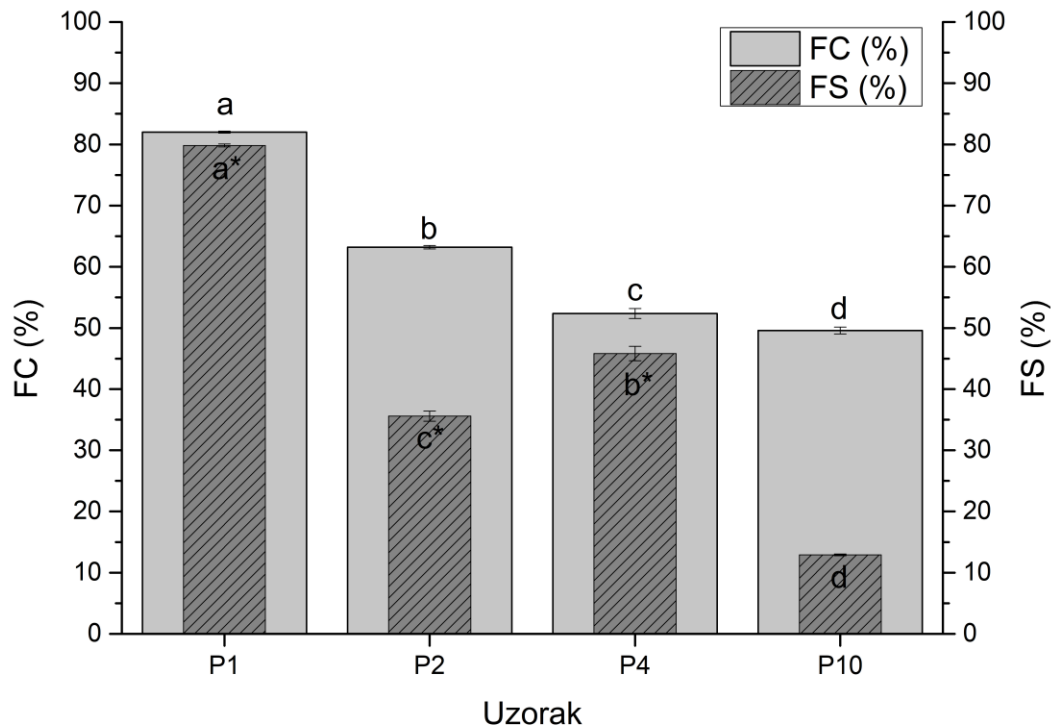
9.6.3. Antioksidativna i funkcionalna svojstva hidrolizata proteina glutena modifikovanih enzimskom hidrolizom u prisustvu Pronaze

Merenjem vrednosti za indeks emulgujuće aktivnosti (EAI) i emulgujuće stabilnosti (ESI) je ispitana mogućnost primene hidrolizata glutena kao emulgujućeg agensa. U sistemima u kojima je neophodno obložiti kapi uljane faze peptidima kako se one ne bi ponovo sjedinile, peptidi moraju biti adsorbovani na površini kapljice. Vrednosti *EAI* i *ESI* pripremljenih hidrolizata prikazani su na **Slici 9.6.3**. Najveće unapređenje *ESI* vrednosti postignuto je primenom veće količine Pronaze, a samim tim i postignut veći stepen hidrolize. S obzirom da stepen hidrolize direktno utiče na funkcionalna svojstva proteina, najveći porast vrednosti emulgujućih svojstava zabeležen je u slučaju uzorka gde je gluten tretiran najvećom količinom enzima (P10). *EAI* ovog uzorka je značajno unapređen u odnosu na ostale uzorke, $44,05 \pm 0,68 \text{ m}^2/\text{g}$. *ESI* vrednost istog uzorka je takođe poboljšana u odnosu na ostale uzorke, $1,39 \pm 0,63 \text{ h}$. Hidroliza Pronazom je poboljšala vrednosti emulgujućih svojstava za ~ 4 puta, u poređenju sa netretiranim sirovim glutenom.



Slika 9.6.3. Indeksi emulgjuće aktivnosti (EAI) i emulzione stabilnosti (ESI) hidrolizata glutena Pronazom. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ($n=2$). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima u istoj seriji merenja su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Dalje, ispitani su kapacitet penjenja (FC , %) i stabilnost pene (FS , %). Rezultati ovih merenja prikazani su na **Slici 9.6.4**. Sa porastom količine primenjenog enzima, a samim tim i stepena hidrolize, kapacitet i stabilnost pena hidrolizata opada. Najveći kapacitet penjenja postignut je primenom 1 mg/ml enzima, $82,02 \pm 0,16\%$, pri čemu se ovaj rezultat značajno razlikuje od ostalih uzoraka. Takođe, najveća stabilnost pene od $79,83 \pm 0,24\%$ izmerena je za isti uzorak. Ekstenzivnijom hidrolizom došlo je do smanjenja dužine lanaca peptida, a samim tim i do smanjenja efikasnosti formiranja stabilnih pena. Na osnovu rezultata ovih merenja možemo zaključiti da se Pronaza može primeniti za dobijanje peptida koji imaju sposobnost formiranja izuzetno stabilne pene visokog kapaciteta (uzorak P1), pri čemu je smanjen alergeni potencijal.



Slika 9.6.4. Kapacitet (FC) i stabilnost (FS) pene hidrolizata glutena Pronazom. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ($n=2$). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima u istoj seriji merenja su statistički značajno različite ($p < 0,05$).

Bioaktivnim peptidima se smatraju bioaktivni sastojci poreklom iz hrane, dužine 3–20 aminokiselina. Ovi terapijski sastojci ne ispoljavaju štetne efekte i ostaju neaktivni dokle god se nalaze u sastavu svog matičnog proteina. Ovi proteini se mogu osloboditi tokom postupka enzimske hidrolize i tada mogu postati aktivni (Aluko, 2008; Korhonen & Pihlanto, 2003). Pripremljenim hidrolizatima glutena P1, P2, P4 i P10 ispitana je sposobnost neutralisanja slobodnog ABTS^{•+} radikala, sposobnost doniranja vodonika slobodnom DPPH radikal, kao i sposobnost heliranja jona Fe²⁺. U slučaju neutralisanja slobodnog ABTS^{•+} radikala, najveću sposobnost pokazao je uzorak P10, sa $69,07 \pm 4,12\%$ ($p < 0,05$). Sa porastom količine primenjenog enzima, raste i vrednost antioksidativne aktivnosti uzoraka (Tabela 9.14). Svi uzorci su pokazali značajno unapređenje stepena neutralisanja ABTS radikalskog katjona u poređenju sa netretiranim glutenom. Primenom Pronaze moguće je proizvesti peptide sa $>50\%$ ABTS aktivnosti koji imaju sposobnost da neutrališu slobodni ABTS radikal. IC₅₀ vrednosti (mg/ml) su izmerene za sve uzorke, i na osnovu podataka (Tabela 9.15) možemo zaključiti da nema značajne razlike među hidrolizatima. Na osnovu ovih podataka možemo zaključiti da je i najmanja količina enzima bila dovoljna da se dobiju hidrolizati koji mogu da neutrališu 50% prisutnih radikala u zadatom vremenu reakcije.

DPPH metodom je ispitano u kojoj meri hidrolizati imaju sposobnost doniranja jona vodonika kako bi se DPPH[•] radikal preveo u redukovani, stabilan, DPPH-H oblik. Antioksidativna aktivnost izmerena DPPH metodom imala je nešto niže vrednosti od one izmerene ABTS metodom. Među uzorcima nije zabeležena značajna razlika u aktivnosti ($p > 0,05$), stoga hidrolizati pri istoj koncentraciji proteina pokazuju gotovo identične aktivnosti. Na osnovu rezultata (Tabela 9.14) možemo zaključiti da nastali peptidi imaju istu antioksidativnu moć bez obzira na postignuti stepen hidrolize. Merenjem IC₅₀ vrednosti (mg/ml) (Tabela 9.15) dodatno je potvrđeno da među uzorcima nema značajne razlike u afinitetu za doniranje jona vodonika.

Na kraju, merenjem aktivnosti heliranja jona metala Fe²⁺ primećene su razlike među uzorcima. Primena veće količine enzima rezultovala je i u većoj helirajućoj aktivnosti. Helirajuća

aktivnost > 50% zabeležena je kod uzoraka P4 i P10. IC_{50} vrednosti (mg/ml) (**Tabela 9.15**) izmerene za helatnu aktivnost, su pokazale da se uzorci P4 i P10 značajno razlikuju od P1 i P2, dok su oni međusobno jednaki. Na osnovu ovih podataka moguće je zaključiti da u slučaju proizvodnje antioksidativnih peptida glutena pomoću Pronaze nije potrebno primeniti više od 4 mg/ml enzima. U slučaju antioksidativnih aktivnosti, viši stepen hidrolize ne garantuje i veću sposobnost neutralizacije slobodnih radikala i vezivanje jona metala.

Tabela 9.14. Antioksidativne aktivnosti ABTS (%), MICA (%) i DPPH (%) sirovog glutena i hidrolizata glutena Pronazom.

Uzorak	ABTS, %	MICA, %	DPPH, %
Gluten	7,52 ± 0,22 ^b	n.o.*	n.o.*
P1	52,84 ± 1,37 ^b	32,17 ± 1,38 ^b	34,89 ± 6,24 ^a
P2	62,27 ± 0,98 ^{ab}	29,21 ± 0,57 ^b	39,89 ± 1,15 ^a
P4	62,97 ± 6,28 ^{ab}	64,49 ± 6,36 ^a	37,68 ± 1,48 ^a
P10	69,07 ± 4,12 ^a	58,42 ± 1,88 ^a	39,33 ± 0,28 ^a

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($n=2$). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima u istoj seriji merenja su statistički značajno različite ($p < 0,05$). n.o.* – nije određeno.

Tabela 9.15. IC_{50} (mg/ml) vrednosti antioksidativne aktivnosti ABTS (%), MICA (%) i DPPH (%) sirovog glutena i hidrolizata glutena Pronazom.

Uzorak	IC_{50} , mg/ml		
	ABTS	MICA	DPPH
Gluten	63,12 ± 20,85 ^b	n.o.*	n.o.*
P1	3,101 ± 0,359 ^a	3,957 ± 0,009 ^b	5,93 ± 0,911 ^a
P2	2,503 ± 0,493 ^a	4,937 ± 0,023 ^a	6,18 ± 0,079 ^a
P4	2,116 ± 0,294 ^a	2,923 ± 0,408 ^c	5,87 ± 0,020 ^a
P10	2,249 ± 0,072 ^a	3,295 ± 0,140 ^{bc}	5,30 ± 0,151 ^a

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija ($n=2$). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima u istoj seriji merenja su statistički značajno različite ($p < 0,05$). n.o.* – nije određeno.

9.7. Antimikrobna svojstva hidrolizata proteina glutena modifikovanih enzimskim postupcima i mikrotalasnim tretmanom

Proteini su svoju primenu našli u formulacijama koje se primenjuju za sprečavanje rasta i razvoja patogenih mikroorganizama. Sa pojavom sve veće mikrobne rezistencije na postojeće preparate, savremena istraživanja se usmeravaju i ka pronalaženju adekvatnih zamena ili suplemenata za antimikrobne preparate u cilju daljeg sprečavanja njihovog rasta. Veliki broj postojećih proteinskih derivata za koje je ustanovljeno da imaju antimikrobne aktivnosti i dalje nisu našli primenu u krajnjim proizvodima usled problema dostupnosti, toksičnosti i cene proizvodnje (Talapko, et al., 2022). Kao naročit problem se izdvajaju patogeni sojevi *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus* i drugi, za koje je zabeleženo da su doprineli ukupnom broju od čak 250000 smrtnih slučajeva (Murray, et al., 2022).

Antimikrobni peptidi se uglavnom sastoje od 10–60 aminokiselina čiji bočni ostaci direktno utiču na naelektrisanje i hidrofobnost, usled čega antimikrobni peptidi različito mogu delovati na ćelijske membrane bakterija (Huan, Kong, Mou, & Yi, 2020; Le, Fang, & Sekaran, 2017; Torres, Sothiselvam, Lu, & Fuente-Nunez, 2019). Kao i u slučaju antioksidativnih aktivnosti, preterano smanjena dužina peptidnih lanaca tokom postupka hidrolize može dovesti do gubitka antimikrobnih svojstava, što je u literaturi objašnjeno gubitkom sposobnosti da sekundarnom strukturom naruše strukturu membrane (Luo, et al., 2017). Jedna od glavnih prepreka u primeni antimikrobnih peptida

se ogleda u različitim uslovima u kojima peptid treba da deluje, tačnije rezultati dobijeni *in vitro* se realno mogu razlikovati od onih *in vivo*. S tim u vezi, sam postupak oralne primene ovih peptida se dodatno poskupljuje, jer je potrebno izvršiti kompletnu optimizaciju načina isporučivanja peptida u organizam (Vlieghe, Lisowski, Martinez, & Khrestchatisky, 2011). Ovi peptidi se još uvek uglavnom koriste za površinsku primenu. Međutim, u farmaceutskoj industriji je u porastu trend primene nanotehnologija u cilju očuvanja stabilnosti antimikrobnih peptida za širu primenu (Sajjad, et al., 2023; Makowski, Silva, Do Amaral, Gonçalves, & Santos, 2019). Film baziran na modifikovanom glutenu u kombinaciji sa prahom breze je ispoljio antimikrobnu aktivnost i sposobnost očuvanja svežine voća i povrća, pri čemu je biodegradabilan, otporan na vodu, a s obzirom na ekonomsku isplativost može se u budućnosti razmatrati za neku širu primenu (Chen, Li, Qin, Han, & Qi, 2022). Hidrofilni filmovi napravljeni od nanovlakana rastvora glutena uz dodatak glicerol monolaurata su pokazali unapređenu antimikrobnu aktivnost prema *E. coli* i *S. aureus*, i predloženo je da se u daljim istraživanjima ispita mogućnost primene ovakvih filmova kao dodatak materijalima za pakovanje hrane (Zhang, et al., 2020). U literaturi se teško mogu naći podaci o antimikrobnim svojstvima hidrolizata glutena, stoga je mogućnost poređenja sa literaturnim podacima ograničena. Svim hidrolizatima kojima su prethodno analizirane antioksidativne sposobnosti u poglavljima 8.6.1–3 je određena i antimikrobna aktivnost (Tabela 9.16) na 3 odabrana mikroorganizma, pri čemu je rezultat izražen u vidu prisustva (+) i odsustva (-) prozirnih zona inhibicije oko bunarčića u koji je sipan uzorak. Zbog nepravilnog oblika dobijenih zona inhibicije rezultat je izražen na ovaj način.

Tabela 9.16. Antimikrobne aktivnosti hidrolizata glutena.

Uzorak	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Gluten	-	-	-
Brašno	-	-	-
GK45	-	-	-
GK90	-	-	-
GK135	-	-	-
GK	-	-	-
GHMT45	-	-	-
GHMT90	-	-	-
GHMT135	-	-	-
GHMT	-	-	-
HB 5% (w/w)	-	-	-
HB 10% (w/w)	-	-	-
HB 15% (w/w)	-	-	-
HB 15% (w/w) – 15 min	+	-	-
HB 15% (w/w) – 30 min	-	+	-
HB 15% (w/w) – 45 min	+	-	-
P1	-	-	-
P2	-	-	-
P4	-	-	-
P10	-	-	-

Zabeleženo je da polazne sirovine nisu imale antimikrobnu aktivnost kao ni hidrolizati glutena sa i bez mikrotalasnog pretretmana. Hidrolizati proteina brašna su pokazali najveću antimikrobnu aktivnost prema soju *E. coli*, zabeleženo za uzorke HB 15% (w/w) – 15 min i HB 15% (w/w) – 45 min. Osim toga za uzorak HB 15% (w/w) – 30 min je zabeleženo antimikrobno dejstvo prema *S. aureus*. U slučaju delovanja na *C. albicans* nije bilo moguće sa sigurnošću utvrditi bistru zonu oko

rasta kolonija, stoga je rezultat uzet kao negativan. Hidrolizati dobijeni Pronazom nisu pokazali antimikrobne aktivnosti ni prema jednom od ispitivanih sojeva. Negativni rezultati se mogu objasniti time da dobijeni peptidi nisu sačinjeni od kombinacije aminokiselina koje imaju sposobnost da spreče razvoj testiranih patogenih sojeva. U slučaju pozitivnih rezultata, pozitivno delovanje na inhibiciju rasta se može objasniti postojanjem odgovarajuće konformacije sekundarne strukture uz prisustvo aminokiselina koje daju neophodno naelektrisanje i hidrofobnost. Iako su pokazali određeni nivo aktivnosti, hidrolizatima za koje je zabeležen pozitivan rezultat na inhibiciju rasta patogenih sojeva neophodno je dalje izvršiti dodatne provere. Kao jedan od mogućih koraka u daljim ispitivanjima bi se mogla primeniti ultrafiltracija kako bi se dodatno ispitala antimikrobne aktivnosti frakcija različitih molekulskih masa, čime bi se ujedno izvršilo i njihovo izdvajanje. Sve uzorke bi potom trebalo testirati *in vivo*.

9.8. Modelovanje enzimske hidrolize primenom Box-Behnken eksperimentalnog plana

Studija optimizacije enzimske hidrolize u cilju dobijanja bioaktivnih peptida sa smanjenim alergenicim svojstvima izvedena je kako bi se detaljnije ispitali uticaji svih procesnih parametara na stepen hidrolize i odabrana svojstva dobijenih bioaktivnih peptida poput sadržaja glutena i antioksidativne aktivnosti određene na osnovu dve metode. U cilju optimizacije enzimske hidrolize pomoću endopeptidaze Alkalaze, potrebno je varirati procesne parametre jedan po jedan, pri čemu svi ostali moraju biti nepromenjeni. Pomoću statističke metode odzivnih površina, tačnije Box-Behnken modela, možemo doći do kvalitetne optimizacije procesa i objašnjenja međusobne povezanosti zadatih reakcionih parametara. Upotrebom ovog modela je moguće ispitati efekte procesnih parametara na hidrolizu kao i njihove međusobne interakcije, što je u ovom radu ispitano modelom koji sadrži 4 faktora sa 29 nezavisnih eksperimenata. U **Tabeli 9.17** prikazane su empirijske jednačine odzivnih funkcija, dok su u **Tabeli 9.18** detaljno prikazani svi eksperimentalni uslovi i dobijeni eksperimentalni rezultati. Količina supstrata (S) izražena je preko količine unetih proteina, dok su merenja antioksidativne i helirajuće aktivnosti izvedene pri 3,6 mg/ml. U **Tabeli 9.19** dati su statistički podaci koji se odnose na odzivne funkcije Y_1-4 , kao što su koeficijent determinacije, Fišerov test, greške u fitovanju i drugo.

Tabela 9.17. Odzivne funkcije odabranih svojstava hidrolizata proteina brašna, izražene preko kodiranih vrednosti odabranih faktora.

Odzivna funkcija	Empirijska jednačina polinoma drugog reda sa značajnim faktorima
DH, %	$Y_1 = 4,19 + 0,36 \times A + 0,25 \times B + 1,69 \times C - 0,17 \times D - 0,14 \times A \times B + 0,047 \times A \times C + 0,16 \times A \times D - 0,030 \times B \times C + 0,029 \times B \times D + 0,085 \times C \times D - 0,12 \times A^2 - 0,10 \times B^2 - 1,26 \times C^2 - 0,21 \times D^2$
Relativni sadržaj glutena, %	$Y_2 = 24,48 + 2,24 \times A - 4,27 \times B - 13,20 \times C + 1,05 \times D - 15,14 \times A \times C - 6,38 \times B \times C + 6,33 \times C \times D + 12,40 \times C^2$
ABTS, %	$Y_3 = 48,44 + 4,36 \times A + 0,3341 \times B + 11,73 \times C - 1,12 \times D + 0,6013 \times A \times B - 0,7289 \times A \times C + 2,19 \times A \times D - 2,46 \times B \times C - 0,6742 \times B \times D - 0,9840 \times C \times D - 1,49 \times A^2 - 1,80 \times B^2 - 8,41 \times C^2 - 1,01 \times D^2$
MICA, %	$Y_4 = 67,85 + 33,67 \times A + 5,95 \times B + 30,88 \times C + 0,8022 \times D + 0,5773 \times A \times B + 18,82 \times A \times C + 3,85 \times A \times D - 3,04 \times B \times C - 8,18 \times B \times D - 2,79 \times C \times D - 14,75 \times A^2 + 0,9128 \times B^2 - 19,00 \times C^2 - 3,03 \times D^2$

Tabela 9.18. Eksperimentalna postavka Box-Behnken modela sa 3 nivoa i 4 odziva.

Broj	Eksperimentalne varijable				Eksperimentalni odzivi			
	pH	T, °C	E/S, %	S, g	DH, %	Relativni sadržaj glutena, %	ABTS, %	MICA, %
1	7	50	5,5	2	8,67	11,11	38,70	2,21
2	9	50	5,5	2	18,32	34,55	41,98	81,21
3	7	60	5,5	2	16,24	23,74	42,71	8,61
4	9	60	5,5	2	23,14	10,73	48,40	89,92
5	8	55	1,0	1	1,58	14,46	25,36	6,79
6	8	55	10,0	1	20,04	16,19	52,33	75,09
7	8	55	1,0	3	0,70	14,26	23,25	5,06
8	8	55	10,0	3	19,69	26,14	46,28	62,21
9	7	55	5,5	1	15,50	21,77	45,41	6,25
10	9	55	5,5	1	19,29	15,85	54,66	79,44
11	7	55	5,5	3	8,07	35,15	34,33	4,16
12	9	55	5,5	3	15,43	28,66	52,33	92,77
13	8	50	1,0	2	1,08	35,53	24,13	1,80
14	8	60	1,0	2	1,55	21,33	30,32	16,86
15	8	50	10,0	2	18,34	58,47	52,55	79,92
16	8	60	10,0	2	19,07	20,31	48,91	82,82
17	7	55	1,0	2	0,97	21,29	24,34	2,12
18	9	55	1,0	2	1,45	22,63	33,82	5,45
19	7	55	10,0	2	19,38	27,49	47,67	14,99
20	9	55	10,0	2	23,14	25,89	54,23	93,62
21	8	50	5,5	1	13,48	25,48	46,65	39,66
22	8	60	5,5	1	17,53	27,31	43,51	75,18
23	8	50	5,5	3	12,94	35,04	52,04	62,53
24	8	60	5,5	3	17,87	33,35	46,21	65,31
25	8	55	5,5	2	21,10	52,60	48,32	70,92
26	8	55	5,5	2	14,24	25,56	54,15	61,88
27	8	55	5,5	2	18,99	34,85	47,67	67,56
28	8	55	5,5	2	15,82	61,48	46,06	51,73
29	8	55	5,5	2	17,60	77,53	45,99	57,15

Tabela 9.19. Rezultati dobijeni statističkom obradom podataka pomoću ANOVA metode.

Odzivna funkcija	Koeficijent determinacije (R^2)	Verovatnoća (p -vrednost)	Fišerov test (F -vrednost)	Koeficijent varijabilnosti (CV)	Greška u fitovanju	Aдекватna preciznost
$Y1 - DH$	0,9785	< 0,0001	45,52	7,84	4,90	21,011
$Y2 -$ <i>Relativni sadržaj glutena</i>	0,6945	0,0008	5,68	34,43	2,45	9,977
$Y3 - ABTS$	0,9014	< 0,0001	9,14	10,05	1,95	10,3086
$Y4 - MICA$	0,9449	< 0,0001	17,15	24,08	2,60	15,8612

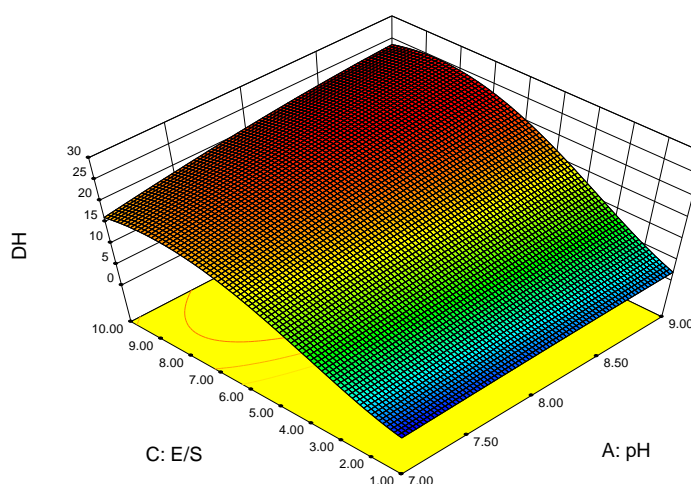
9.8.1. Uticaj ispitanih procesnih parametara na stepen hidrolize pšeničnog brašna

Na osnovu podataka dobijenih pomoću metode odzivnih površina, jednačina drugog reda data je kao Y_1 u **Tabeli 9.18**. Odziv za Y_1 sadrži u sebi pH, temperaturu, E/S odnos i sadržaj proteina, grafički prikazano na **Slikama 9.8.1** i **9.8.2**. Na osnovu eksperimentalnih podataka, najveći stepeni hidrolize od 23,14% postignuti su pri pH 9 i 55 °C, kada je E/S odnos bio 10,0%, a takođe i pri pH 9, 60 °C i 5,5% E/S. Na osnovu modela, zaključuje se da na stepen hidrolize bitno utiču ulazni faktori, i to pH, E/S odnos i temperatura. Takođe, za modelovanje je bitno istaći da vrednost kvadrata E/S odnosa ima značajan uticaj na model, dok između parametara nema značajne interakcije.

Najlošiji stepen hidrolize 0,70% postignut je pri pH 8, 55 °C i 1,0% E/S, pri čemu treba istaći da su skoro podjednako loši rezultati stepena hidrolize bili i pri ostalim kombinacijama ulaznih faktora pH (7–9) i temperature (50–60 °C) sa 1,0% E/S. Veći uticaj na enzimsku hidrolizu u pogledu procesnih parametara ispoljila je pH vrednost u poređenju sa temperaturom. Razlog za navedeno najverovatnije leži u činjenici da se pri različitim pH vrednostima u osegu 7 do 9 pšenično brašno drugačije ponaša, da se strukturna mreža glutena na različit način razvija i time omogućava drugačiji pristup endopeptidazi Alkalazi peptidnim vezama. Takođe, analizirane temperature nisu značajno uticale na samu proteinsku sirovinu, što se može pripisati jednakom ponašanju skroba na temperaturama od 50 do 60 stepeni. Najoptimalnija temperatura za hidrolizu modelom je označena kao 55 stepeni. Povećanje E/S odnosa uslovljava veće vrednosti stepena hidrolize, u čitavom opsegu reakcione pH. Povećanjem koncentracije supstrata evidentno je da pri povećanju koncentracije enzima (E/S odnosa) pri najvećim vrednostima dolazi do blagog pada ostvarenog stepena hidrolize. Navedeno je najverovatnije rezultat inhibicije enzima supstratom u višku, zbog čega se srednja vrednost supstrata od 2 g može smatrati najadekvatnijom.

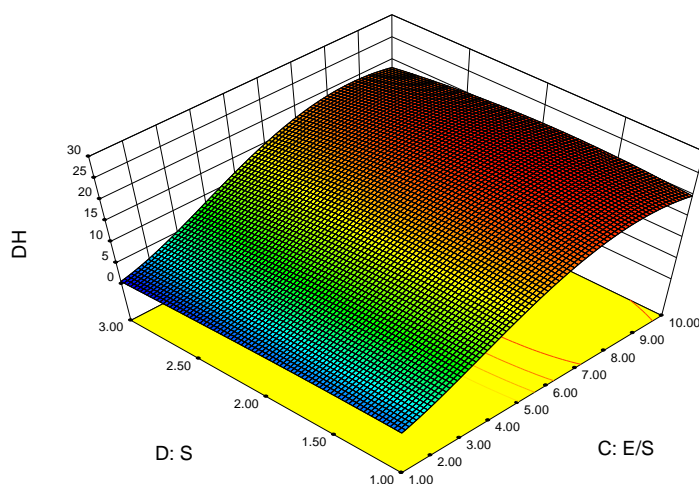
Statistička p -vrednost je manja od 0,0001, što implicira da je primenjeni model statistički podoban. Značajni faktori za empirijsku jednačinu modela stepena hidrolize su A, B, C, D i C^2 . Na osnovu F vrednosti od 45,52 se takođe zaključuje da je model značajan. Vrednost za grešku u fitovanju od 4,90 ukazuje na to da postoji 6,96% šanse da taj nedostatak fitovanja potiče od šuma. Vrednost koeficijenta determinacije, R^2 , iznosi 0,9785 na osnovu čega se takođe može zaključiti da je model odgovarajući.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Original Scale
DH
23.14
0.7
X1 = A: pH
X2 = C: E/S
Actual Factors
B: T = 55.00
D: S = 1.99



Slika 9.8.1. Prikaz odzivne površine stepena hidrolize hidrolizata proteina brašna: uticaj pH reakcije i E/S.

Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Original Scale
 DH
 23.14
 0.7
 X1 = C: E/S
 X2 = D: S
 Actual Factors
 A: pH = 8.03
 B: T = 55.00



Slika 9.8.2. Prikaz odzivne površine stepena hidrolize hidrolizata proteina brašna: uticaj E/S odnosa i sadržaja supstrata (S).

9.8.2. Uticaj ispitanih procesnih parametara na alergenost pšeničnog brašna

Na osnovu podataka dobijenih pomoću modela, empirijska jednačina odziva za alergenost, (Y_2), data je u **Tabeli 9.18**. Na osnovu podataka o stepenu hidrolize postignutim pod određenim uslovima (pH, T) moguće je izvesti određene zaključke koji se odnose na sadržaj alergeni epitopa u uzorku. Nema značajne interakcije između samih ulaznih parametara, značajni faktori za modelovanje su C, AC i C^2 (A – pH reakcije, C – E/S odnos).

Na osnovu eksperimentalnih podataka, žaključuje se da najveći uticaj na smanjenje alergenosti, ispitano na Box-Behnken modelu, imaju pH i E/S odnos (**Slika 9.8.3**). Najveće smanjenje alergenosti postignuto je pri pH 9,0 i pri 10,0% E/S.

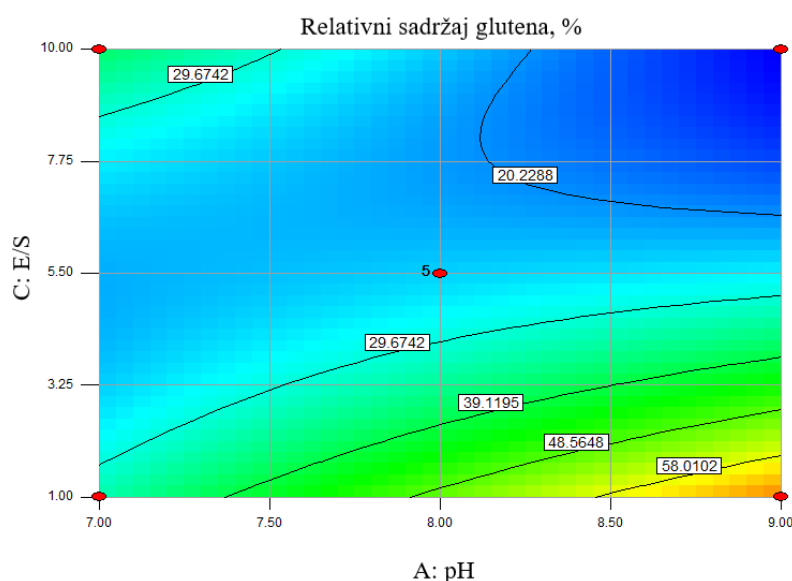
Na osnovu podataka iz tabele 6. vrednost R^2 (0,6945) je niska što ukazuje na loše fitovanje modela. Sam model je značajan, što se vidi na osnovu F -vrednosti (5,68), jer postoji samo 0,08% šansi da ova vrednost modela vodi poreklo od šuma. Vrednost greške u fitovanju iznosi 2,45, pri čemu ta vrednost nije značajna, stoga možemo zaključiti da model valjano fituje eksperimentalne rezultate. Međutim, prediktovana vrednost R^2 iznosi -0,0309, što ukazuje na to da je predikcija koju daje model neadekvatna i da je potencijalno bolje koristiti sveobuhvatnu srednju vrednost.

Design-Expert® Software

Relativni sadržaj glutena
 ● Design Points
 77.5345
 10.7282

X1 = A: pH
 X2 = C: E/S

Actual Factors
 B: T = 55.00
 D: S = 2.00



Slika 9.8.3. Prikaz odzivne površine alergenosti hidrolizata proteina brašna: uticaj pH reakcije (A) i E/S odnosa (C).

9.8.3. Uticaj ispitanih procesnih parametara na antoskidativnu aktivnost pšeničnog brašna

U **Tabeli 9.18** jednačinama Y_3 i Y_4 su date empirijske jednačine odzivnih površina za ABTS i MICA aktivnosti. Kada je ispitivana sposobnost hidrolizata proteina brašna da neutrališe ABTS radikalski katjon, izveden je zaključak da su međusobne interakcije između ulaznih parametara pH i temperature značajne, kao i da su faktori A, C i C^2 značajni za model (A – pH reakcije, C – E/S odnos). Kod metal-jon helatne aktivnosti, postoji ipak više značajnih interakcija među parametrima.

Značajne interakcije među parametrima kod ABTS antioksidativne aktivnosti su A, C i C^2 . F -vrednost modela od 9,14 ukazuje na to da je model značajan, i da postoji tek 0,01% mogućnosti da ova vrednost modela potiče od šuma. Nedostatak fitovanja u vrednosti od 1,95 ukazuje na to da nedostatak nije značajan, što je u skladu sa tim da model treba adekvatno da fituje eksperimentalne rezultate.

Značajne interakcije među parametrima kod metal-jon helatne aktivnosti su A, C, AC, A^2 i C^2 . F -vrednost modela od 17,15 ukazuje na to da je model značajan, i da postoji tek 0,01% mogućnosti da ova vrednost modela potiče od šuma. Vrednost nedostatka fitovanja od 2,60 ukazuje na to da nedostatak fitovanja nije značajan, što znači da je model adekvatan za opisivanje zavisnosti metal-jon helatne aktivnosti od navedenih parametara.

Reakcioni uslovi imaju direktan uticaj na krajnje osobine hidrolizata. Dobijene odzivne površine prikazane na **Slici 9.8.4** ukazuju na to da se pri temperaturama reakcije nižim od optimalne i pri niskim enzim-supstrat (E/S) odnosima ne mogu proizvesti bioaktivni peptidi sa zadovoljavajućim antioksidativnim svojstvima. pH reakcije hidrolize i E/S odnos imaju direktan uticaj na antioksidativne aktivnosti dobijenih hidrolizata (**Slika 9.8.5**). Reakcioni uslovi koji podrazumevaju visoke pH i E/S vrednosti veoma pogoduju nastanku bioaktivnih peptida sa visokim antioksidativnim aktivnostima (ABTS i MICA), što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima za stepen hidrolize (**Slika 9.8.1**). Opseg pH vrednosti od 7 do 9 pri malim vrednostima E/S odnosa nema pozitivan uticaj na proizvodnju bioaktivnih peptida koji imaju sposobnost neutralisanja ABTS radikala.

Za razliku od neutralisanja ABTS radikala, proizvodnja peptida za heliranje jona metala Fe^{2+} je još specifičniji postupak. U ovom slučaju izuzetna kombinacija vrednosti E/S odnosa i pH reakcije (**Slika 9.8.5b**) omogućavaju da se tokom enzimske reakcije produkuju bioaktivni peptidi sa velikim potencijalom prema heliranju jona metala Fe^{2+} . Veći stepen hidrolize dobijen pod odgovarajućim pH reakcije i pri visokom E/S odnosu u direktnoj je korelaciji sa aktivnijim bioaktivnim peptidima. Kao što je prethodno prikazano na **Slici 9.8.3**, najveće smanjenje alergenosti među hidrolizatima glutena je postignuto takođe prilikom primene visokih pH vrednosti reakcije i E/S odnosa. Na osnovu ovih rezultata možemo zaključiti da E/S odnos i pH reakcije smeše u najvećoj meri vrše uticaj na proizvodnju bioaktivnih peptida sa smanjenim alergenim svojstvima. Na osnovu odzivnih površina prikazanih na **Slici 9.8.6** vidi se očigledan uticaj i važnost E/S odnosa na antioksidativne aktivnosti peptida.

Za razliku od metal-jon helatne aktivnosti, sposobnost dobijenih peptida da uklone radikalski katjon pri istoj koncentraciji proteina je kod svih uzoraka iznad 10%. S obzirom da su sve vrednosti u opsegu 23–54% aktivnosti, značajno je istaći da je primenom Alkalaze moguće dobiti biološki aktivne peptide koji poseduju mogućnost uklanjanja radikalskog katjona. Na osnovu dobijenih odzivnih površina na **Slici 9.8.7**, ABTS aktivnost dobijenih hidrolizata nije u tolikoj meri uslovljena reakcionim uslovima pod kojim su proizvedeni (pH i temperatura), za razliku od helatne aktivnosti hidrolizata čija je aktivnost direktno uslovljena reakcionim uslovima. Povećanjem pH reakcije i količine supstrata postižu se veće vrednosti MICA aktivnosti peptida. Uticaj pH reakcije i količine supstrata ima uticaja na MICA aktivnost hidrolizata. Povećanjem vrednosti pH reakcije i količine unetog supstrata u sistem postiže se proizvodnja peptida sa većom sposobnošću heliranja jona metala (**Slika 9.8.8**).

Na osnovu eksperimentalnih podataka i rezultata, prikazanih u **Tabeli 9.18**, možemo zaključiti da pH 7 u potpunosti ne odgovara proizvodnji bioaktivnih peptida koji imaju sposobnost heliranja jona metala, bez obzira na ostale reakcione uslove. Na proizvodnju bioaktivnih peptida sa

visokom metal-jon helatnom aktivnošću (> 80%) pozitivno deluju pH vrednosti 8 i 9, kao i temperature 55 i 60 °C. Proizvodnja peptida sa relativno visokom metal-jon helatnom aktivnošću je veoma zavisna od pH i temperature pri kojima se odvija enzimaska hidroliza, što nas dovodi do zaključka da je proizvodnja peptida sa ovim svojstvima veoma osetljiv postupak. Sa napretkom u polju enzimske industrije, moguće je pažljivim odabirom enzimskog preparata proizvesti određene tipove peptida koji poseduju bioaktivna svojstva (Aluko, 2008). U cilju dobijanja hidrolizata glutena, postupkom hidrolize proteina pšeničnog brašna, sa određenim željenim antioksidativnim svojstvima neophodno je odabrati pogodne reakcione uslove za njihovu proizvodnju.

a) Factor Coding: Actual

ATBS (%)

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

23.2507  54.6647

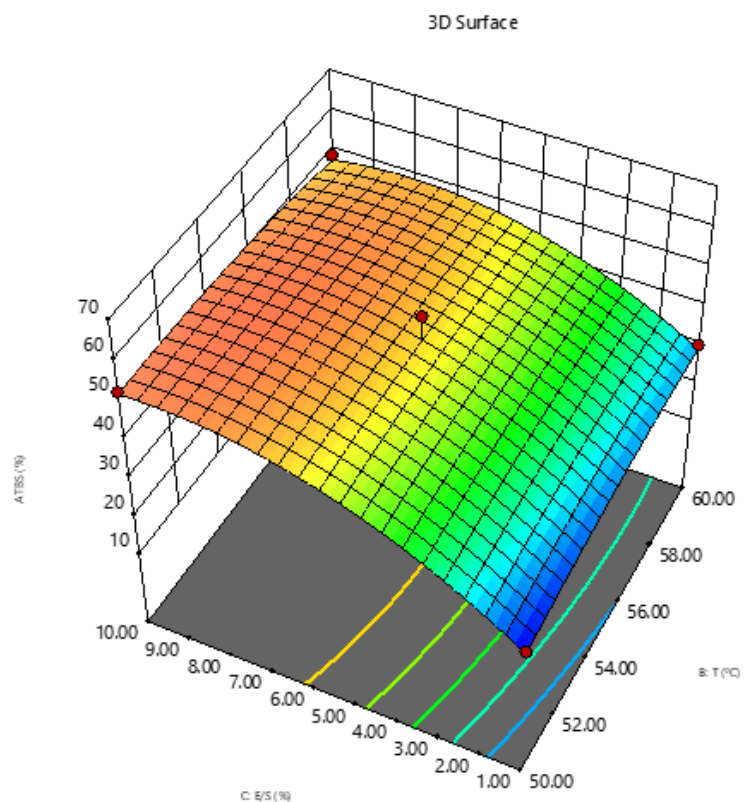
X1 = B

X2 = C

Actual Factors

A = 8.00

D = 2.00



b) Factor Coding: Actual

MICA (%)

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

1.79966  93.6163

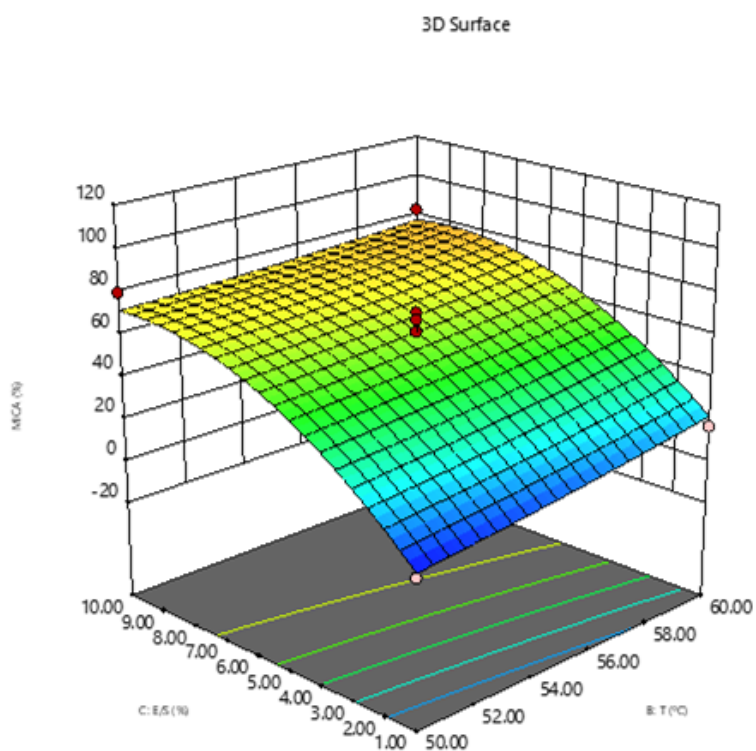
X1 = B

X2 = C

Actual Factors

A = 8.00

D = 2.00



Slika 9.8.4. Prikaz odzivne površine stepena a) inhibicije ABTS radikala i b) heliranja jona metala, hidrolizata proteina brašna: uticaj temperature reakcije hidrolize i E/S odnosa.

a) Factor Coding: Actual

ATBS (%)

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

23.2507  54.6647

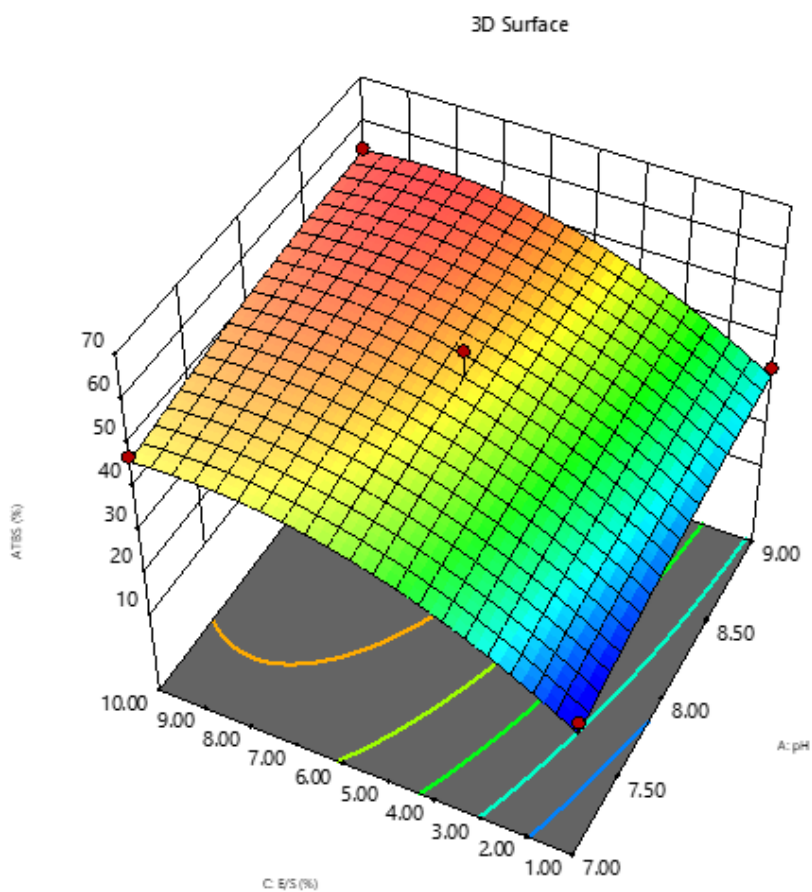
X1 = A

X2 = C

Actual Factors

B = 55.00

D = 2.00



b) Factor Coding: Actual

MICA (%)

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

1.79966  93.6163

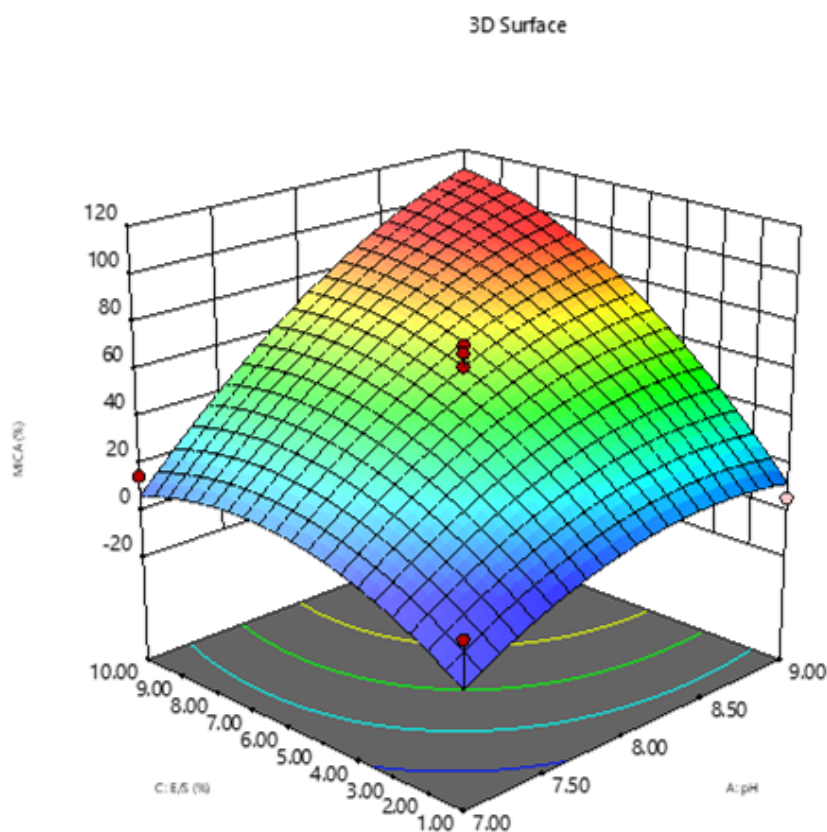
X1 = A

X2 = C

Actual Factors

B = 55.00

D = 2.00



Slika 9.8.5. Prikaz odzivne površine stepena a) inhibicije ABTS radikala i b) heliranja jona metala, hidrolizata proteina brašna: uticaj pH reakcije hidrolize i E/S odnosa.

a) Factor Coding: Actual

ATBS (%)

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

23.2507  54.6647

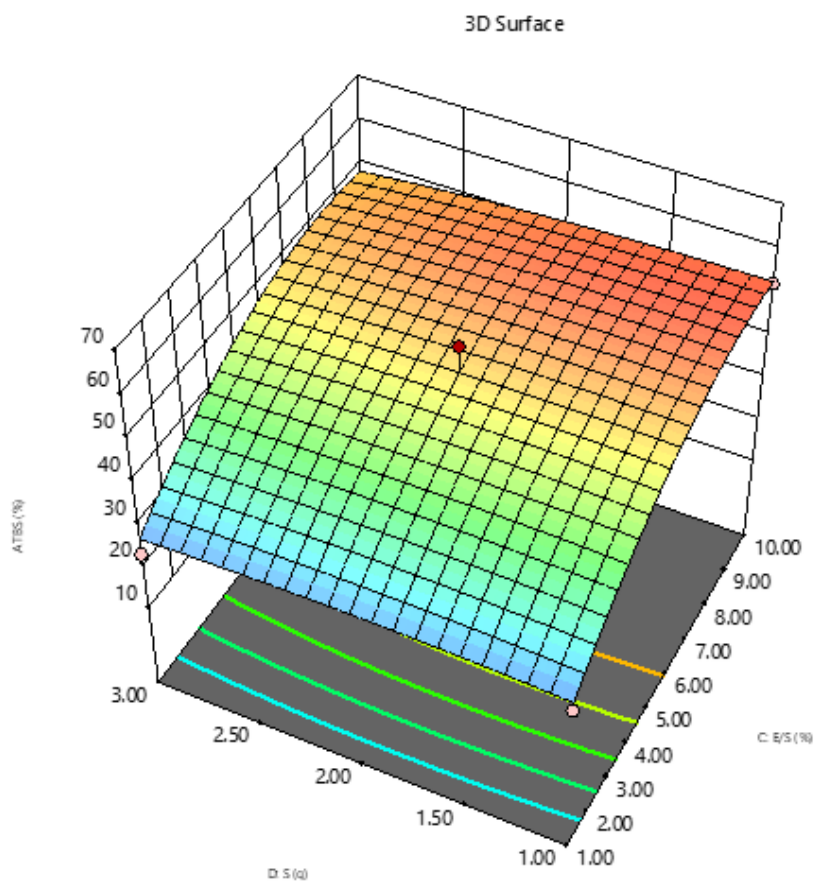
X1 = C

X2 = D

Actual Factors

A = 8.00

B = 55.00



b) Factor Coding: Actual

MICA (%)

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

1.79966  93.6163

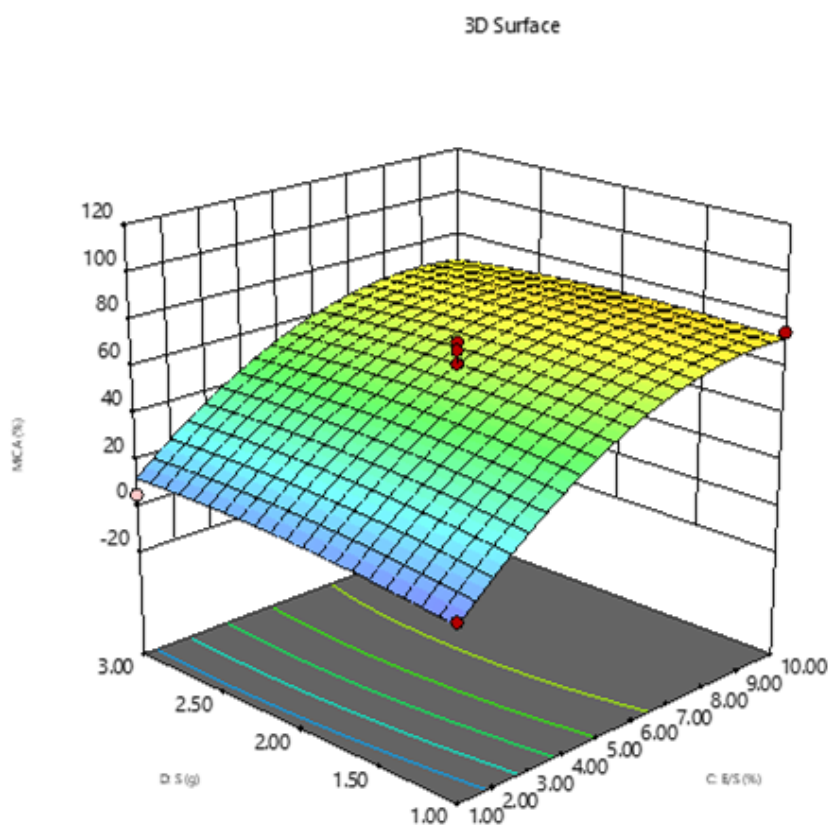
X1 = C

X2 = D

Actual Factors

A = 8.00

B = 55.00



Slika 9.8.6. Prikaz odzivne površine stepena a) inhibicije ABTS radikala i b) heliranja jona metala, hidrolizata proteina brašna: uticaj sadržaja supstrata (S) i E/S odnosa.

a) Factor Coding: Actual

ATBS (%)

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

23.2507  54.6647

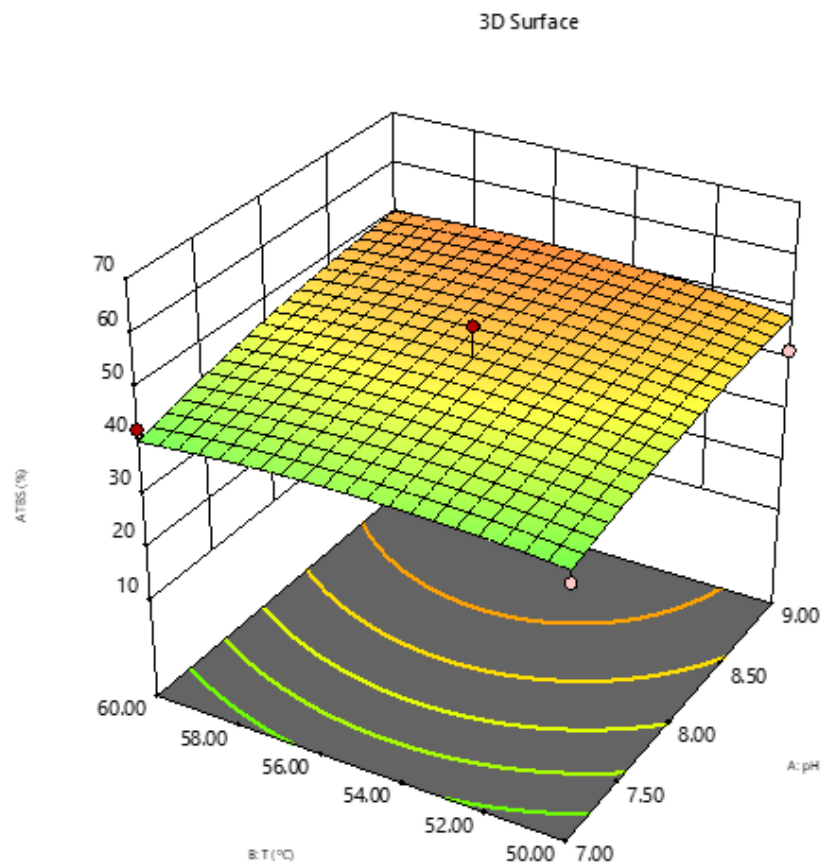
X1 = A

X2 = B

Actual Factors

C = 5.50

D = 2.00



b) Factor Coding: Actual

MICA (%)

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

1.79966  93.6163

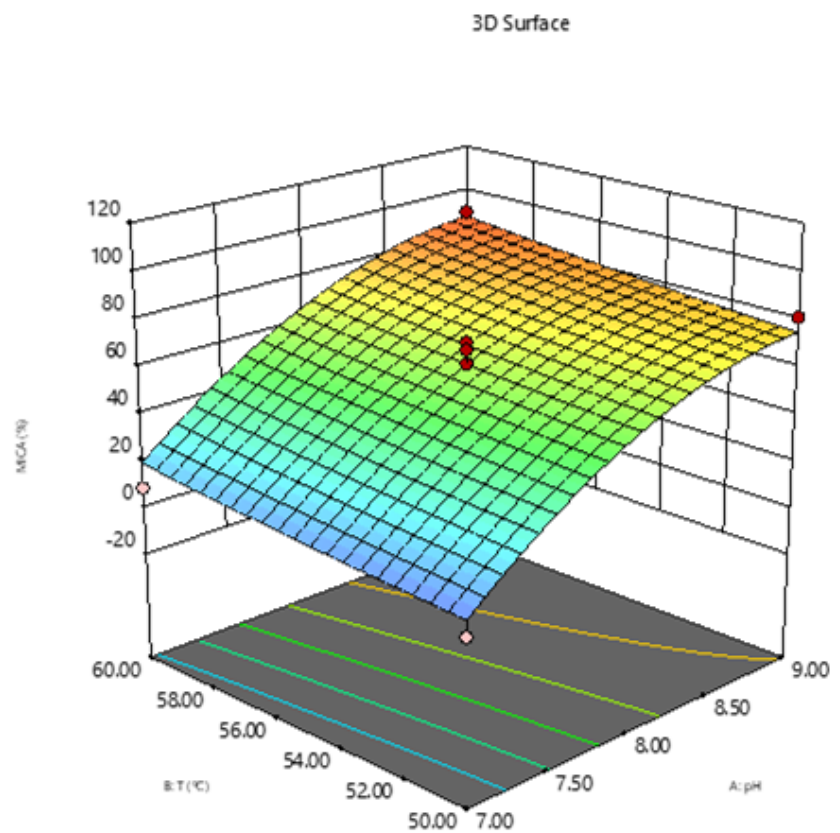
X1 = A

X2 = B

Actual Factors

C = 5.50

D = 2.00



Slika 9.8.7. Prikaz odzivne površine stepena a) inhibicije ABTS radikala i b) heliranja jona metala, hidrolizata proteina brašna: uticaj T i pH reakcije.

Factor Coding: Actual

3D Surface

MICA (%)

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

1.79966  93.6163

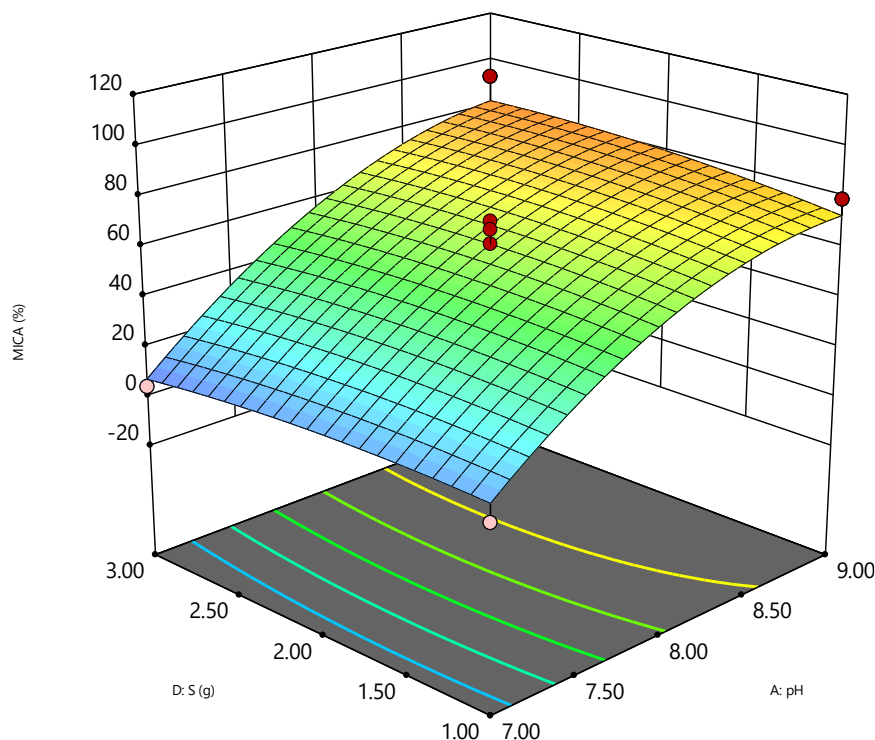
X1 = A

X2 = D

Actual Factors

B = 55.00

C = 5.50



Slika 9.8.8. Prikaz odzivne površine stepena heliranja jona metala, hidrolizata proteina brašna: uticaj pH reakcije hidrolize i sadržaja supstrata (S).

9.9. Miksolab analiza

9.9.1. Analiza uticaja dodatka hidrolizata proteina brašna na reološke osobine heljdnog integralnog brašna

Miksolab je uređaj koji je kreiran u cilju analize svojstava testa pri simultanom dejstvu mešanja i temperature. Standardni protokol koji je kreiran za potrebe analize pšeničnog brašna koji u sebi sadrži gluten podrazumeva da je za validnu analizu neophodno postići konzistenciju od $1,1 \pm 0,05$ Nm, koja se uzima kao referentna vrednost (Banu & Aprodu, 2022). Međutim, kod brašna koje u sebi ne sadrži gluten (heljdino integralno brašno) postizanje ovog parametra nije obavezno s obzirom na to da se tehnologije pripreme bezglutenskih proizvoda razlikuju. Međutim, kako bi rezultati reoloških merenja bili uporedivi, poželjno je da se ispuni ovaj uslov. Kako bi se postigla zadata konzistencija, stepen hidracije bezglutenskog brašna treba da se podesi za svaki uzorak. Ukoliko uporedimo termo-mehanički profil pšeničnog brašna (Slika 7.1.) i heljdnog integralnog brašna (sa i bez supstitucije, Slika 9.9.1.) možemo uočiti značajne razlike u profilima i vrednostima izmerenih parametara. Naime, do modifikacije standardnog protokola je moralo doći usled nemogućnosti izvođenja analize do kraja primenom heljdnog integralnog brašna. Do prekida u merenju je dolazilo usled održavanja formiranog testa na lopaticama i posledično odsustva merenja momenta torzije (Nm). Ovo opažanje, a potom i modifikacija protokola, su u skladu sa zaključcima koje su izneli (Torbica, Hadnađev, Dokić, & Sakač, 2008). Razlike u profilima su posledica hemijskog sastava brašna, kao i stepena hidracije neophodnog za postizanje željene konzistencije, kao i ponašanja testa tokom zagrevanja/hlađenja i mešanja. Heljdino integralno brašno je odabrano za rad s obzirom na to da je bogato vitaminima B grupe, ima visok sadržaj proteina koji pozitivno utiču na ljudsku ishranu, bogato je aminokiselinama (lizin, metionin i triptofan), mineralima, kao i

nutrijentima koji su prepoznati kao bioaktivni (Coțovanu & Silvia, 2021). S obzirom na odsustvo glutena i nemogućnosti formiranja glutenske mreže, od interesa je bilo obogatiti ovo integralno brašno hidrolizatima proteina brašna sa smanjenim sadržajem alergeni epitopa. Ovo je rađeno u cilju oplemenjivanja heljdinog integralnog brašna u vidu dodatka hidrolizata proteina pšeničnog brašna kojima je potvrđeno prisustvo bioaktivnih komponenti.

Rezultati prikazani u **Tabeli 9.20.** su pokazali da je neophodna količina vode za postizanje željene konzistencije značajno različita među uzorcima. Naime, heljdino integralno brašno je zahtevalo veći stepen hidracije nego heljdino integralno brašno supstituisano sa 5% hidrolizata proteina brašna (HB 15% (w/w)). Niska vrednost mehaničkog slabljenja proteina (MSP) povezana je sa većom vrednošću izmerenog momenta torzije nakon 8 minuta mešanja, što ukazuje na veću stabilnost testa tokom mešanja (Banu & Aprodu, 2021). Smanjena vrednost MSP zabeležena je kod heljdinog integralnog brašna supstituisanog sa 5% hidrolizata proteina brašna 15% (w/w), 9,57%, što ukazuje na prisustvo različitih vrsta proteina brašna i njihove osobine. Stabilnost testa je definisana kao vreme tokom kog testo uspešno pruža otpor tokom mešanja nakon postizanja maksimalnog momenta torzije, C1 (Cingöz, Akpınar, & Sayaslan, 2023).

Tabela 9.20. Rezultati Miksolab analize heljdinog integralnog brašna i heljdinog integralnog brašna supstituisanog sa hidrolizatom proteina brašna HB 15% (w/w) (Modifikovani Chopin + protokol).

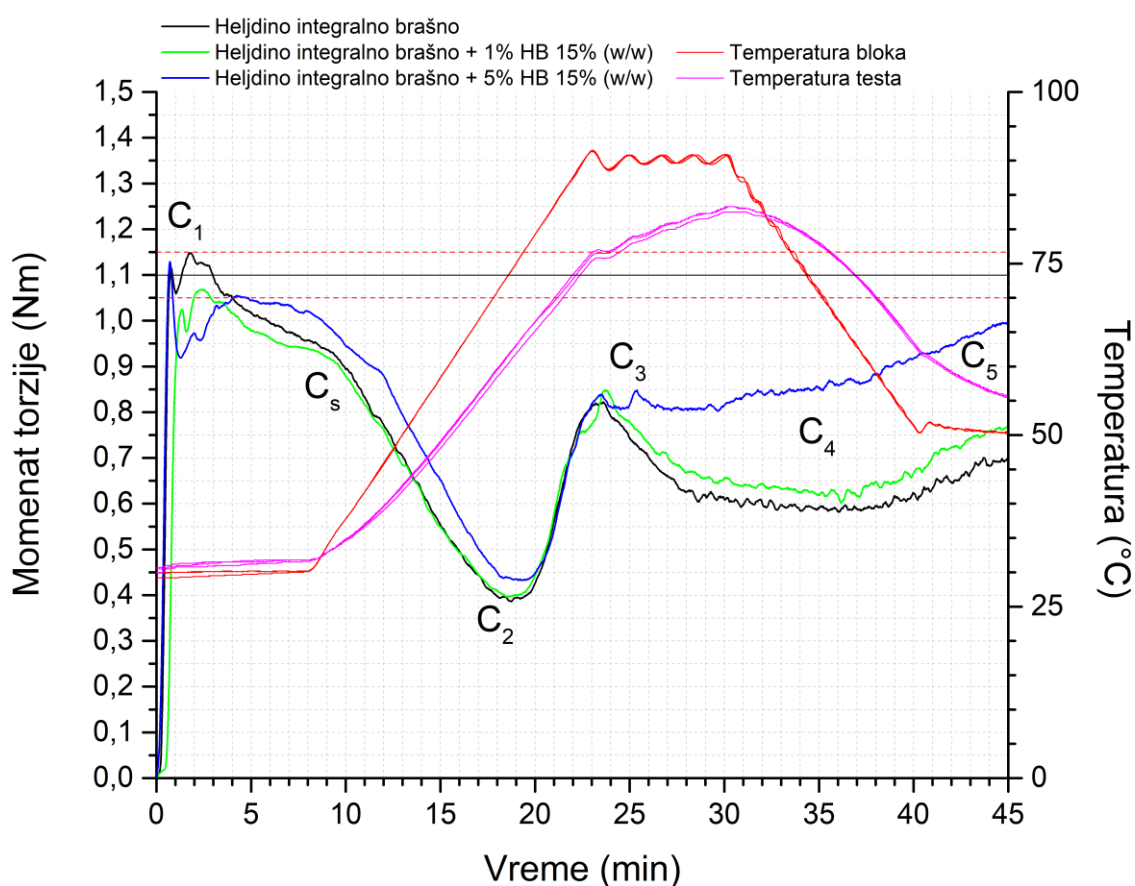
Uzorak	HIB	HIB + 1% HB 15% (w/w)	HIB + 5% HB 15% (w/w)
Stepen hidracije (b14%), %	60,2	59,9	53,8
Vreme razvoja testa, min	4,8	5,8	0,7
Stabilnost testa, min	8,3	8,6	8,9
Amplituda, Nm	0,028	0,022	0,149
CS	0,958	0,939	1,021
C2	0,386	0,396	0,433
C3	0,822	0,848	0,848
C4	0,582	0,601	0,803
C5	0,694	0,771	0,996
α , Nm/min	-0,088	-0,056	-0,072
β , Nm/min	0,170	0,202	0,134
γ , Nm/min	0,000	0,022	-0,014
C1-C2, Nm	0,762	0,672	0,696
C3-C2, Nm	0,436	0,452	0,415
C3-C4, Nm	0,240	0,247	0,045
C5-C4, Nm	0,112	0,17	0,193
MSP, %	16,55	12,08	9,57
TMSP, %	49,83	50,84	52,08
Stabilnost skrobne paste	0,71	0,71	0,95
PRS, %	16,14	22,05	19,38

HIB – heljdino integralno brašno, HIB + 1% HB 15% (w/w) – heljdino integralno brašno supstituisano sa 1% HB 15% (w/w), HIB + 5% HB 15% (w/w) – heljdino integralno brašno supstituisano sa 5% HB 15% (w/w)

Tokom druge faze analize, sa porastom temperature dolazi do smanjenja vrednosti momenta torzije do vrednosti C2, tj. dolazi do smanjenja konzistencije testa (Hadnađev, Torbica, & Hadnađev, 2011; Cingöz & Yörükoğlu, 2022). Tokom ovog koraka grejanja zamese, proteini su podvrgnuti promenama u sekundarnoj, tercijarnoj i kvarternernoj strukturi (Schmiele, Felisberto, Clerici, & Chang, 2017). Smeša heljdinog integralnog brašna supstituisana sa 5% hidrolizata proteina brašna HB 15% (w/w) pokazala je manje smanjenje u vrednosti C2 u odnosu na ostale uzorke, što je pokazatelj da je došlo do manjeg slabljenja proteinske strukture u testu, što je poželjno (Cingöz, Akpınar, & Sayaslan, 2023). Na kraju druge faze se očitava vrednost brzine slabljenja proteinske

strukture (α , Nm/min), koja predstavlja nagib između poslednje tačke u prvoj fazi i poslednje tačke (C2) u drugoj fazi. Smanjenje vrednosti nagiba je pokazatelj da je brzina propadanja proteinske strukture veća.

U trećoj fazi analize skrobne materije preuzimaju glavnu ulogu, dok promene koje se dešavaju u strukturi proteina nemaju više toliko uticaja na vrednost izmerenog momenta torzije. Povećanje vrednosti momenta torzije je pokazatelj bubrenja prisutnih skrobnih granula usled apsorpcije vode. Izmerene vrednosti C3 za odabrane uzorke nisu pokazale značajne razlike među njima, iako su vrednosti za uzorke delom supstituisanih sa hidrolizatima proteina brašna pokazale nešto veću vrednost u odnosu na kontrolu. Što su izmerene vrednosti brzine geliranja skroba (β , Nm/min) bliže 1, to je veća viskoznost testa, tačnije testo je tvrđe (Cingöz & Yörükoğlu, 2022). Ova vrednost je bila najviša kod heljdinog integralnog brašna supstituisanog sa 1% hidrolizata brašna HB 15% (w/w), 0,202 Nm/min, dok je kod heljdinog integralnog brašna supstituisanog sa 5% hidrolizata brašna HB 15% (w/w) vrednost bila 0,134 Nm/min. Na osnovu ovoga možemo zaključiti da povećana količina dodatih hidrolizata proteina brašna negativno utiče na brzinu geliranja skroba.



Slika 9.9.1. Mixolab® krive ispitanog heljdinog integralnog brašna, heljdinog integralnog brašna supstituisanog sa 1% HB 15% (w/w) i heljdinog integralnog brašna supstituisanog sa 5% HB 15% (w/w). Ciljana vrednost konzistencije zamese postavljena je na $C1=1,1 \pm 0,0$ Nm.

Smanjenje vrednosti momenta torzije u četvrtoj fazi (C4) analize je rezultat fizičkog oštećenja i propadanja skrobnih granula usled simultanog delovanja mešanja i povišene temperature (Hadnađev, Torbica, & Hadnađev, 2011). U ovoj regiji skrobni gel zadržava stabilnost i smatra se regijom koja daje podatak o amilolitičkoj aktivnosti enzima. Smeša heljdinog integralnog brašna supstituisana sa 5% hidrolizata brašna HB 15% (w/w) je pokazala značajno više vrednosti momenta torzije ($C4=0,803$ Nm) u poređenju sa kontrolnim heljdinim integralnim brašnom ($C4=0,582$ Nm). S obzirom na manju razliku u vrednosti između parametara C3 i C4 kod heljdinog integralnog brašna

supstituisanog sa 5% hidrolizata proteina brašna HB 15% (w/w), možemo zaključiti da je kod ovog uzorka manja aktivnost Amilaza (Hadnađev, Torbica, & Hadnađev, 2011). Dodatak hidrolizata čini se da utiče na strukturu geliranog skroba što mu omogućava da duži period zadrži svoju stabilnost. Povećanje vrednosti gama ukazuje na potencijalno smanjenje aktivnosti Amilaza, a time i smanjenje brzine degradacije enzima (Cingöz, Akpınar, & Sayaslan, 2023).

Tokom pete faze analize, koja podrazumeva postupak hlađenja, dolazi do retrogradacije skroba (rekristalizacija i reasocijacija molekula skroba (Gujral, Sharma, & Khatri, 2018)), i samim tim se povećava vrednost momenta torzije C5. Uzorak heljadinog integralnog brašna supstituisanog sa 5% hidrolizata proteina brašna HB 15% (w/w) je pokazao najveću vrednost C5 (0,996 Nm) kao i najvišu vrednost za retrogradaciju skroba. Kontrolno brašno je pokazalo najniže vrednosti C5.

10. Zaključak

Glavni cilj ove doktorske disertacije je bio pronalaženje odgovarajućeg enzimskog preparata u postupku hidrolize glutena čijim delovanjem bi se smanjila alergnost, poboljšala funkcionalna i antioksidativna svojstva. Osim enzimskog tretmana, bilo je neophodno ispitati i mogućnost primene pretretmana u cilju poboljšanja samog postupka enzimske hidrolize. Korišćeni enzimski preparati su odabrani na osnovu učinka u preliminarnim istraživanjima. Primena komercijalne endopeptidaze Alkalaze se pokazala kao najučinkovitija u studiji sprovedenoj za potrebe izrade ove disertacije. Rezultati su pokazali da među testiranim enzimima, ovaj enzim ima najveći potencijal za hidrolizu proteina glutena. Primena mikrotalasnog pretretmana je imala za cilj da ispita da li dejstvom mikrotalasa u mikrotalasnom reaktoru dolazi do strukturnih promena u proteinima glutena i/ili do njihove razgradnje. Osim model sistema gde je korišćen komercijalno dostupni gluten, Alkalaza je primenjena i u realnom sistemu u kom su hidrolizovani proteini pšeničnog brašna, gde su istovremeno bili prisutni proteini pšenice koji grade gluten kao i ugljeni hidrati, skrob pre svega. Na kraju je izvedena studija pomoću metode odzivnih površina od ukupno 29 nezavisnih eksperimenata gde je primenjena Alkalaza u postupku hidrolize brašna da bi se utvrdili optimalni uslovi sa aspekta smanjenja alergnosti. Hidrolizatu brašna sa detektovanim najmanjim sadržajem toksičnih epitopa glutena ispitana je mogućnost primene u realnom sistemu pri formulisanju bezglutenskog proizvoda od heljdinog brašna. Tačnije ispitan je uticaj dodatka hidrolizata brašna na reološke osobine integralnog heljdinog brašna na Miksolabu. Osim Alkalaze, ispitano je i dejstvo enzima Pronaze na mogućnost hidrolizovanja proteina glutena u model sistemu. Kao i kod Alkalaze, hidrolizatima dobijenim dejstvom Pronaze su takođe ispitana sva funkcionalna svojstva, alergnost i strukturne promene. Ovaj deo istraživanja izveden je sa ciljem da se teorijski ispita mogućnost primene još nekog enzima na proteine glutena, a koji se često ne sreće u literaturi.

Prva istraživanja sprovedena su sa ciljem pronalaska inovativnog neinvazivnog fizičkog tretmana koji bi se upotrebio zarad modifikacije molekula proteina glutena i kao pretretman za olakšano i poboljšano delovanje endopeptidaza. U drugom delu istraživanja, gluten je podvrgnut postupku enzimske hidrolize pomoću enzima Alkalaze i Pronaze. U tom delu je u slučaju Alkalaze ispitana mogućnost primene mikrotalasnog pretretmana u cilju poboljšanja dejstva enzima tokom hidrolize. Takođe Alkalaza je primenjena i u sistemu gde su ostale prirodno prisutne skrobne materije među proteinima glutena. Hidroliza Pronazom izvršena je na model sistemu. Glavni zaključci koji se mogu istaći su sledeći:

- Primena mikrotalasnog zračenja različite snage u opsegu 200–800 W na proteine glutena, rezultovala je u smanjenoj detekciji sadržaja glutena u svim tretiranim uzorcima u poređenju sa netretiranim uzorkom polazne sirovine.
- Mikrotaladni tretman sproveden pomoću snage od 200 W rezultovao je u najvećem smanjenju detektovanog relativnog sadržaja glutena, pri čemu su ti uzorci zadržali $39,65 \pm 1,69\%$ svog početnog alergnog sadržaja. Ova snaga mikrotalasa je odabrana za vršenje pretretmana za potrebe dalje enzimske hidrolize i smanjenja alergnosti.
- U slučaju uzorka gde je primenjena snaga od 400 W pretpostavlja se da je do veće vrednosti alergnog sadržaja došlo usled promena u konformaciji proteina, tačnije određeni epitopi glutena postali su dostupniji antitelima koja se koriste u ELISA testu. Povećana snaga mikrotalasa može rezultovati u drugačijim strukturnim promenama za koje se, osim potencijalnog razaranja i izlaganja eptiopa, pretpostavlja da uključuju agregaciju i smanjenu rastvorljivost.
- Primenjene snage mikrotalasa 200–800 W, kao pretretmani za potrebe hidrolize glutena pomoću Alkalaze (pH 8,0, T 60 °C), imali su pozitivan uticaj na unapređenje postupka hidrolize. Naime, svi pretretmani doveli su do značajnog povećanja postignutog stepena hidrolize ($p < 0,05$), pri čemu je najveći stepen hidrolize postignut sa mikrotalasnim pretretmanom od 600 W (DH 32%). Može se zaključiti da mikrotaladni tretman dovodi do promena u strukturi proteina, čime oni postaju lako dostupni enzimu. Zabeležene vrednosti alergnih svojstava međutim ne prate trend

porasta postignutog stepena hidrolize. Naime, statistički značajno veći ($p < 0,05$) sadržaj alergeni epitopa zabeležen je kod hidrolizata pretretiranog sa 600 W. Pretretman snagom od 200 W je u blagoj meri doprineo smanjenju sadržaja proteina glutena u dobijenom hidrolizatu u poređenju sa kontrolnom hidrolizom.

- Primena Alkalaze u postupku hidrolize realnog supstrata, pšeničnog brašna, u sistemu u kom su prisutne skrobne materije, rezultovalo je u postignutim stepenima hidrolize od $18,41 \pm 0,73\%$ do $23,49 \pm 0,64\%$, u zavisnosti od koncentracije pripremljene suspenzije. Kod svih uzoraka zabeleženo je smanjenje sadržaja detektovanih alergeni epitopa u poređenju sa polaznom sirovinom.
- Prisustvo skrobnih materija nije dovelo do ometanja postupka enzimske hidrolize u poređenju sa kontrolnom hidrolizom glutena, naprotiv, prisustvo skrobnih materija se pokazalo kao odlično sredstvo protiv umrežavanja proteina glutena i samim tim omogućen je lakši pristup enzimu peptidnim lancima. Povećana koncentracija skrobnih materija u suspenziji glutena iste zapremine nije poželjna usled smanjene dostupnosti vode, pri čemu se teško izdvajaju hidrolizovani proteini. Maksimalna optimalna koncentracija suspenzije utvrđena je da je 15%.
- Primena enzima Pronaze na model sistemu glutena rezultovala je u porastu stepena hidrolize sa povećanjem količine primenjenog enzima, pri čemu se detektovani alergeni sadržaj glutena smanjuje sa povećanjem postignutog stepena hidrolize.

Nakon izvršenih pretretmana i/ili enzimskih hidroliza, svim uzorcima su ispitane strukturne promene u cilju daljeg objašnjenja uticaja pretretmana i enzimske hidrolize. Primenom FTIR spektroskopije, SDS-PAGE elektroforeze, RP-HPLC hromatografije i merenjem veličina i raspodele čestica bilo je moguće detaljnije utvrditi do kojih promena u strukturi je došlo primenom prethodno pomenutih metoda modifikacije. Neki od zaključaka su sledeći:

- Dekonvolucijom Amid I trake glutena, svih mikrotalasno tretiranih i mikrotalasno pretretiranih hidrolizovanih uzoraka moguće je dobiti uvid u promenu sadržaja delova sekundarne strukture proteina. Mikrotalasni pretretman je sa povećanjem snage mikrotalasa 200–800 W uticao na promenu sadržaja pristunih α -heliksa, pri čemu je najmanji sadržaj zabeležen kod uzorka pretretiranog mikrotalasno snagom od 200 W (16,6%). Značajno povećan sadržaj produženih β -ploča zabeležen je kod uzoraka tretiranih sa 400–800 W što je u saglasnosti sa rezultatima koji se odnose na formiranje disulfidnih veza, dok je kod uzorka tretiranog sa 200 W jedino zabeležena promena u sadržaju intermolekulskih β -ploča. Kod hidrolizata pretretiranih sa 200 i 400 W zabeležena je reorganizacija u ukupnom sadržaju α -heliksa. Kod svih uzoraka (mikrotalasno pretretirani i mikrotalasno pretretirani hidrolizati) zabeleženo je smanjenje intenziteta traka u Amid VI regiji na 560 cm^{-1} u poređenju sa kontrolnim netretiranim uzorkom glutena. S obzirom da se vibracije S–S veza detektuju na ovoj talasnoj dužini, zaključuje se da mikrotalasni pretretman zaista dovodi do promena u broju disulfidnih veza i da deluje u vidu povećanja/smanjenja sadržaja sulfhidrilnih grupa u molekulima proteina glutena. SDS-PAGE elektroforeza mikrotalasno tretiranih uzoraka glutena pokazala je da mikrotalasi nemaju uticaj na primarnu strukturu proteina glutena. Razlike u elektroforetskim profilima zabeležene su kod mikrotalasno (200 W) pretretiranog hidrolizata, gde je zabeleženo potpuno odsustvo frakcija gliadina i glutenina u opsegu molekulskih masa 25–50 kDa. Za isti hidrolizat zabeležena vrednost Zeta potencijala ($-31,03 \pm 2,18 \text{ mV}$) ukazuje na dobru fizičku stabilnost. Hromatogrami hidrolizata glutena pokazali su razlike u količini prisutnih polarnih frakcija polipeptida.
- FTIR spektri hidrolizata brašna (HB), nakon dekonvolucije, pokazali su da je došlo do promena u sekundarnoj strukturi. Povećan sadržaj β -ploča zabeležen je kod svih hidrolizata u poređenju sa polaznom sirovinom, najveći sadržaj α -heliksa kao i najmanji sadržaj jezgara (17,20% i 43,27%, respektivno) među uzorcima hidrolizata zabeležen je kod uzorka HB 15% (w/w). SDS-PAGE elektroforezom pokazano je da

su hidrolizom uklonjene sve frakcije peptida veće od 40 kDa, i da je povećano prisustvo peptida manjih od 25 kDa kod svih hidrolizata. Naelektrisanje svih uzoraka hidrolizata je značajno promenjeno, međutim izmerene vrednosti potencijala ukazuju na to da ovi hidrolizati ne formiraju stabilne rastvore. Hromatogrami zabeleženi za sve uzorke ističu razlike u polarnosti dobijenih hidrolizata.

- Hidrolizati Pronaze su pokazali promene u sekundarnoj strukturi primenom različite koncentracije enzima, a najveća promena zabeležena je u sadržaju β -ploča. Sa povećanjem količine primenjenog enzima, Pronaza ima dobar učinak u uklanjanju frakcija glutena veličine 15–40 kDa, međutim na frakcije manje od ~20 kDa nije imala zabeležen uticaj. Uzorak sa najvećim stepenom hidrolize pokazao je najveće naelektrisanje, i značajnu promenu u hromatografskom profilu u poređenju sa ostalim uzorcima.
- Funkcionalna svojstva hidrolizata glutena (GK) i mikrotalasno pretretiranog hidrolizata glutena (GHMT) su unapređena u odnosu na polaznu sirovinu. Najveći indeks emulgujuće aktivnosti zabeležen je kod GHMT posle 135 min hidrolize ($50,66 \pm 3,10 \text{ m}^2/\text{g}$), dok je najveća emulgujuća stabilnost mikrotalasno pretretiranog hidrolizata zabeležena nakon 45 min hidrolize ($3,06 \pm 0,42 \text{ h}$). Uzorak krajnjeg hidrolizata je pokazao najveću emulgujuću stabilnost ($3,30 \pm 0,31 \text{ h}$). Kapacitet penjenja je kod oba hidrolizata pokazao maksimalnu vrednost nakon 45 min hidrolize (60%), dok se stabilnost formiranih pena razlikuje, i to nepretretirani hidrolizat je maksimalnu vrednost stabilnosti pene pokazao nakon 45 min hidrolize, dok je kod mikrotalasno pretretiranog hidrolizata maksimum zabeležen nakon 135 min hidrolize. U oba slučaja, ekstenzivnom hidrolizom su značajno smanjeni kapacitet formiranja (< 50%) i stabilnost (< 20%) formirane pene. Mikrotalasni pretretman je značajno ($p < 0,05$) smanjio kapacitet penjenja krajnjeg hidrolizata u poređenju sa kontrolnom hidrolizom.
- Ispitivanjem antioksidativnih i metal jon helatnih aktivnosti, mikrotalasno pretretirani hidrolizat glutena je pokazao statistički značajnu razliku u aktivnosti heliranja jona metala. Međutim, oba hidrolizata su pokazala relativno visok stepen sposobnosti neutralizacije ABTS radikala (> 60%), dok su za neutralizaciju DPPH radikala zabeležene aktivnosti od 30–50%. Metal-jon helatne aktivnosti svih uzoraka bile su izuzetno visoke, čime se ovo svojstvo hidrolizata glutena izdvaja u odnosu na ostala. Mikrotalasni pretretman je imao svoj značajni doprinos u smanjenju IC_{50} vrednosti (mg/ml) hidrolizata glutena prilikom merenja sposobnosti neutralizacije DPPH radikala.
- Detaljnijim ispitivanjem frakcija hidrolizata glutena sa i bez pretretmana pomoću ultrafiltracije, pokazano je da mikrotalasni pretretman zaista ima značajan doprinos za proizvodnju peptida manjih molekulskih masa 3–10 kDa sa većim afinitetom za heliranje jona Fe^{2+} . Među frakcijama oba hidrolizata nisu zabeležena značajnija odstupanja u aktivnostima frakcija prema ABTS radikalu, međutim, neznatno poboljšanje u aktivnosti prema DPPH radikalu su ispoljile frakcije mikrotalasno tretiranog hidrolizata veličine 3–10 kDa.
- Mikrotalasni pretretman se može koristiti u svrhe proizvodnje hidrolizata glutena sa unapređenim funkcionalnim i antioksidativnim svojstvima uz smanjenu alergenost.
- Emulgujuća svojstva brašna značajno su unapređena postupkom hidrolize, pri čemu je najveća vrednost zabeležena kod hidrolizata brašna HB 10% (w/w) ($129,58 \pm 18,10 \text{ m}^2/\text{g}$), što znači da je dovoljna količina hidrolizata adsorbovana na površini uljanih kapi. Stabilnosti emulzija dobijenih pomoću hidrolizata brašna su unapređene, mada ne značajno. Praćenjem hidrolize uzorka sa najmanjom zabeleženom alergenošću, zabeleženo je da kapacitet i stabilnost pene opadaju sa protokom vremena hidrolize. S tim u vezi, najveći doprinos je zabeležen nakon 15 min hidrolize pšeničnog brašna, čime je postignuto da kapacitet penjenja bude unapređen preko 30% u odnosu na

početni uzorak, dok se ista razlika beleži i za stabilnost pene. Kontrolisanim postupkom hidrolize moguće je proizvesti hidrolizate sa unapređenim funkcionalnim svojstvima.

- U poređenju sa polaznim uzorkom, za sve hidrolizate je zabeležena unapređena aktivnost prema neutralisanju ABTS radikala, pri čemu je najveća aktivnost zabeležena kod uzorka HB 15% (w/w) nakon 45 min hidrolize ($72,67 \pm 1,16\%$). Analizom uzoraka tokom vremena nije zabeležena značajna razlika u ABTS aktivnosti nakon 15 min hidrolize. Merenjem DPPH aktivnosti maksimum je zabeležen takođe kod uzorka HB 15,0% (w/w) nakon 15 min hidrolize, $43,88 \pm 7,12\%$, dok je kod ostalih uzoraka zabeležen pad aktivnosti. Ovime je potvrđeno da manji peptidi nemaju veliku sposobnost neutralisanja DPPH radikala. Merenjem aktivnosti heliranja jona metala, pokazano je da afinitet prema jonu Fe^{2+} raste sa porastom stepena hidrolize, tj sa smanjenjem dužine peptidnih lanaca. Maksimum vrednosti je zabeležen kod HB 10,0% (w/w), $89,53 \pm 0,63\%$. Polovina maksimalne inhibitorne koncentracije uzorka prema jonu Fe^{2+} je u rangu rezultata dobijenih za hidrolizate glutena sa i bez mikrotalasnog pretretmana. Ovim se potvrđuje da prisustvo skrobnih materija ne ometa proces enzimske hidrolize u pogledu proizvodnje bioaktivnih peptida smanjene alergnosti i unapređenih svojstava. Takođe, interesantno je istaći da je do razlike između IC_{50} (mg/ml) vrednosti hidrolizata brašna i hidrolizata glutena sa i bez pretretmana došlo prilikom merenja ABTS i DPP aktivnosti. Svi hidrolizati brašna su pokazali približno dva puta veću IC_{50} (mg/ml) vrednost za ABTS u poređenju sa hidrolizatima glutena, dok je jedino za hidrolizat brašna HB 15,0% (w/w) nakon 15 min hidrolize zabeležena skoro ista IC_{50} (mg/ml) vrednost od $4,26 \pm 1,934$ mg/ml, kao kod hidrolizata glutena.
- Za hidrolizate glutena dobijenih pomoću Pronaze zabeleženo je unapređenje funkcionalnih svojstava sa povećanjem stepena hidrolize. Emulgujuća svojstva su unapređena, pri čemu je najveća vrednost emulgujuće aktivnosti kao i stabilnosti zabeležena kod uzorka sa najvećim postignutim stepenom hidrolize (P 10). Kapacitet i stabilnost pene opadaju sa porastom stepena hidrolize, pri čemu je maksimalna vrednost kapaciteta penjenja zabeležena za uzorak P1, i to $82,02 \pm 0,16\%$. Primenom Pronaze pod kontrolisanim uslovima hidrolize mogu se dobiti peptidi dovoljno velikih dužina da formiraju stabilne pene.
- Kao i u slučaju mikrotalasnog pretretiranog i netretiranog hidrolizata glutena dobijenih pomoću Alkalaze, i kod hidrolizata dobijenih Pronazom zabeležen je isti trend antioksidativnih i metal-jon helatnih aktivnosti. Najveći stepen hidrolize rezultovao je u najvećoj i značajno različitoj aktivnosti prema ABTS radikalu, $69,07 \pm 4,12\%$ ($p < 0,05$). DPPH aktivnost nije značajno unapređena sa porastom stepena hidrolize primenom Pronaze. U poređenju sa ostalim hidrolizatima dobijenih pomoću Alkalaze, IC_{50} (mg/ml) vrednosti ovih uzoraka ne pokazuju značajna odstupanja. Na osnovu ovoga možemo zaključiti da se Pronaza može primeniti u proizvodnji bioaktivnih peptida, i da se može postići isti učinak kao i primenom Alkalaze. Sa porastom stepena hidrolize unapređena je i aktivnost prema heliranju jona Fe^{2+} , što je u relaciji sa do sada objašnjenim rezultatima za sve prikazane hidrolizate. Smanjena vrednost IC_{50} (mg/ml) prema heliranju jona metala je pokazatelj da je Pronaza manje efikasna u proizvodnji bioaktivnih peptida sa afinitetom prema heliranju jona Fe^{2+} .
- Antimikrobne aktivnosti svih pomenutih uzoraka su određene u eksperimentu sa tri patogena soja. Antimikrobne aktivnosti prema *E. coli* pokazali su uzorci HB 15,0% (w/w) nakon 15 i 45 min hidrolize, dok je uzorak HB 15,0% (w/w) – 30 min pokazao aktivnost prema *S. aureus*.

Optimizacija postupka enzimske hidrolize proteina brašna izvršena je primenom metode odzivnih površina, pri čemu su ispitani parametri pH, temperatura, E/S odnos i količina supstrata S (g proteina). Na osnovu dobijenih odzivnih površina, izvedeni su sledeći zaključci:

- pH 9, temperature od 55–60 °C, i E/S odnosi od 5,5–10% su operativni uslovi neophodni za postizanje visokih stepena hidrolize.
- Najveći uticaj na smanjenje alergenosti dobijeno tumačenjem ovog modela imaju pH i E/S odnos. Najveće smanjenje alergenosti zabeleženo je pri pH 9 i E/S od 10,0%.
- Na antioksidativne aktivnosti (ABTS i MICA) hidrolizata najveći uticaj imaju pH i E/S odnos, pri čemu mali E/S odnos ne pogoduje nastanku bioaktivnih peptida, nezavisno od pH.
- Proizvodnja bioaktivnih peptida specifičnih prema jonima Fe²⁺ direktno je uslovljena kombinacijom E/S odnosa i pH reakcije. Značajan doprinos ima i količina supstrata koja se koristi u postupku hidrolize. pH vrednosti 8 i 9 pozitivno deluju na proizvodnju bioaktivnih peptida.

U cilju ispitivanja praktične primene dobijenih hidrolizata za potrebe formulisanja novih proizvoda sa smanjenim sadržajem glutena, hidrolizat brašna je dodat u integralno heljdino brašno i izvršena je kompletna analiza dobijene zamese testa pomoću Miksolaba. Ispitan je uticaj hidrolizata proteina glutena na termo-mehanička svojstva supstituisanog heljdnog integralnog brašna. Na osnovu sprovedenih merenja, ističu se sledeći zaključci:

- Dodatak hidrolizata brašna sa smanjenim sadržajem toksičnih epitopa glutena pozitivno deluje na očuvanje formirane proteinske mreže tokom zagrevanja testa. Dodatak hidrolizovanih proteina glutena ojačava proteinsku strukturu zamese i čini testo stabilnijim.
- Zamesa heljdnog integralnog brašna supstituisana sa 5% HB 15% (w/w) pokazala je smanjenu aktivnost Amilaza, kao i veću stabilnost geliranog skroba.
- Tokom faze retrogradacije skroba, najveće vrednosti parametara izmerene su kod heljdnog integralnog brašna supstituisanog sa 5% HB 15% (w/w).

Pregledom rezultata dobijenih tokom eksperimentalnih istraživanja sprovedenih za potrebe izrade ove disertacije dat je uvid u delovanje mikrotalasnog zračenja na strukturu proteina glutena, njegova alergena i funkcionalna svojstva. Ujedno, primena ovakvog pretretmana predstavlja novinu u sferi istraživanja koja se bave glutenom i samim tim daje doprinos tom naučnom polju. Hidrolizati proteina dobijeni pomoću enzimskih preparata pokazali su da je ostvareno unapređenje funkcionalnih svojstava. Primenom enzimske hidrolize u realnom sistemu poput pšeničnog brašna u kom su proteini glutena prisutni zajedno sa skrobnim materijama, moguće je ostvariti uštede prilikom izdvajanja modifikovanih proteina glutena. Ovako modifikovane proteine glutena moguće je uzeti u razmatranje prilikom kreiranja novih proizvoda sa smanjenim alergenim svojstvima kao i sa unapređenim funkcionalnim svojstvima.

11. Literatura

- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Applied Science Publishers Ltd.
- Allred, L. K., & Ritter, B. W. (2010). Recognition of Gliadin and Glutenin Fractions in Four Commercial Gluten Assays. *Journal of AOAC International*, *93*, 190-196.
- Aluko, R. E. (2008). Determination of nutritional and bioactive properties of peptides in enzymatic pea, chickpea, and mung bean protein hydrolysates. *Journal of AOAC International*, *91*, 947-956.
- Anderson, J. W., Hanna, T. J., Peng, X., & Kryscio, R. J. (2000). Whole grain foods and heart disease risk. *Journal of American College of Nutrition*, 291S-299S.
- Arendt, E. K., & Zannini, E. (2013). Wheat and other Triticum grains. U E. K. Arendt, & E. Zannini (Urednici), *Cereal grains for the food and beverage industries* (str. 1-67e). Sawston, UK: Woodhead Publishing Limited. doi:10.1533/9780857098924.1
- Arentz-Hansen, H., Körner, R., Molberg, O., Quarsten, H., Vader, W., Kooy, Y. M., . . . McAdam, S. N. (2000). The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *Journal of Experimental Medicine*, *191*(4), 603-612. doi:10.1084/jem.191.4.603
- Arentz-Hansen, H., McAdam, S. N., Molberg, Ø., Fleckenstein, B., Lundin, K. E., Jørgensen, T. J., . . . Sollid, L. M. (2002). Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology*, *123*(3), 803-809. doi:10.1053/gast.2002.35381
- Ashraf, S., Saeed, S., Sayeed, S., & Ali, R. (2012). Impact of microwave treatment on the functionality of cereals and legumes. *International Journal of Agriculture & Biology*, *14*, 356-370.
- Asrarkulova, A. S., & Bulushova, N. V. (2018). Wheat gluten and its hydrolysates. Possible fields of practical use. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *54*(9), 825-833.
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, *72*, 4-15.
- Banik, S., Bandyopadhyay, S., & Ganguly, S. (2003). Bioeffects of microwave--a brief review. *Bioresource technology*, *87*(2), 155-159. doi:10.1016/s0960-8524(02)00169-4
- Banu, I., & Aprodu, I. (2021). Influence of Rice Variety and Freezing on Flour Properties. *Applied Sciences*, *11*(12), 5716. doi:10.3390/app11125716
- Banu, I., & Aprodu, I. (2022). Investigations on Functional and Thermo-Mechanical Properties of Gluten Free Cereal and Pseudocereal Flours. *Foods*, *11*(13), 1857. doi:10.3390/foods11131857
- Benucci, I., Caso, M. C., Bavaro, T., Masci, S., Keršienė, M., & Esti, M. (2020). Prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* immobilized on a food-grade carrier for the production of gluten-reduced beer. *Food Control*, 106987. doi:10.1016/j.foodcont.2019.106987
- Bezbradica, D., Mijin, D., Mihailović, M., & Knežević-Jugović, Z. (2009). Microwave-assisted immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® supports. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *84*, 1642-1648. doi:10.1002/jctb.2222
- Biesiekierski, J. R. (2017). What is gluten? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *32*(Suppl. 1), 78-81.
- Box, G. E., & Behnken, D. W. (1960). Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. *Technometrics*, *2*(4), 455-475. doi:10.1080/00401706.1960.10489912
- Briani, C., Samaroo, D., & Alaedini, A. (2008). Celiac disease: From gluten to autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, *7*(8), 644-650. doi:10.1016/j.autrev.2008.05.006
- Bronstein, H. D., Haeffner, L. J., & Kowlessar, O. D. (1966). Enzymatic digestion of gliadin: the effect of the resultant peptides in adult celiac disease. *Clinica Chimica Acta*, *14*(2), 141-155.

- Brouns, F., Hemery, Y., Price, R., & Anson, N. M. (2012). Wheat Aleurone: Separation, Composition, Health Aspects, and Potential Food Use. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(6), 553-568. doi:10.1080/10408398.2011.589540
- Campaña, L. E., Sempé, M. E., & Filgueira, R. R. (1986). Effect of Microwave Energy on Drying Wheat. *Cereal Chemistry*, 63(3), 271-273.
- Cappelli, A., Oliva, N., & Cini, E. (2020). A Systematic Review of Gluten-Free Dough and Bread: Dough Rheology, Bread Characteristics, and Improvement Strategies. *Applied Sciences*, 10, 6559. doi:10.3390/app10186559
- Catassi, C., & Fasano, A. (2008). 1 - Celiac disease. U E. K. Arendt, & F. Dal Bello (Urednici), *Food Science and Technology, Gluten-Free Cereal Products and Beverages* (str. 1-27). Academic Press.
- Chalamaiah, M., Jyothirmayi, T., Diwan, P. V., & Dinesh Kumar, B. (2015). Chalamaiah, M., Jyothirmayi, T., Diwan, P. V., & Dinesh Kumar, B. (2015). Antioxidant activity and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe (egg). *Journal of food science and technology*, 52(9), 5817-5825. doi:10.1007/s13197-015-1714-6
- Cheftel, J. C. (1977). Chemical and nutritional modification of food proteins due to processing and storage. U J. R. Whitaker, & S. R. Tannenbaum (Urednici), *Food Proteins* (str. 401-445). Westport, CT, USA: Avi Publishing Co.
- Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F., & Nokihara, K. (1996). Antioxidant Activity of Designed Peptides Based on the Antioxidative Peptide Isolated from Digests of a Soybean Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2619-2623. doi:10.1021/jf950833m
- Chen, P., & Zhang, L. (2006). Interaction and properties of highly exfoliated soy protein/montmorillonite nanocomposites. *Biomacromolecules*, 7(6), 1700-1706.
- Chen, Y., Li, Y., Qin, S., Han, S., & Qi, H. (2022). Antimicrobial, UV blocking, water-resistant and degradable coatings and packaging films based on wheat gluten and lignocellulose for food preservation. *Composites Part B: Engineering*, 238, 109868. doi:10.1016/j.compositesb.2022.109868
- Chopra, A. K., & Mathur, D. K. (1983). Factors Affecting Protease Production by *Bacillus stearothermophilus* RM- 67. *Journal of Food Protection*, 46(12), 1020-1025.
- Ciacci, C., Ciclitira, P., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Ludvigsson, J. F., McGough, N., . . . Swift, G. L. (2015). The gluten-free diet and its current application in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *United European Gastroenterology Journal*, 3(2), 121-135. doi:10.1177/2050640614559263
- Ciccocioppo, R., Di Sabatino, A., & Corazza, G. R. (2005). The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 140, 408-416.
- Cingöz, A., & Yörükoğlu, T. (2022). Determination of Rheological Properties of Alternative Flour Substituted Doughs . *Black Sea Journal of Agriculture*, 5(4), 392-400. doi:10.47115/bsagriculture.1141895
- Cingöz, A., Akpınar, Ö., & Sayaslan, A. (2023). Rheological properties of dough by addition of wheat bran hydrolysates obtained at different temperatures. *Journal of Cereal Science*, 109, 103612. doi:10.1016/j.jcs.2022.103612
- Coates, J. (2000). Interpretation of infrared spectra, a practical approach. U R. A. Meyers (Ur.), *Encyclopedia of analytical chemistry* (str. 10815-10837). Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Cornell, H. J. (1974). Circulating antibodies to wheat gliadin fractions in coeliac disease. *Archives of Disease in Childhood*, 49, 454-458.
- Cornell, H. J., & Wills-Johnson, G. (2001). Structure-activity relationships in coeliac-toxic gliadin peptides. *Amino Acids*, 21, 243-253.
- Coțovanu, I., & Silvia, M. (2021). Buckwheat Seeds: Impact of Milling Fractions and Addition Level on Wheat Bread Dough Rheology. *Applied Sciences*, 11(4), 1731. doi:10.3390/app11041731
- Cui, C., Zhao, H., Zhao, M., & Chai, H. (2011). Effects of extrusion treatment on enzymatic hydrolysis properties of wheat gluten. *Journal of Food Process Engineering*, 34(2), 187-203.

- Curiel, J. A., Coda, R., Limitone, A., Katina, K., Raulio, M., Giuliani, G., . . . Gobbetti, M. (2014). Manufacture and characterization of pasta made with wheat flour rendered gluten-free using fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria. *Journal of Cereal Science*, 59(1), 79-87. doi:10.1016/j.jcs.2013.09.011
- Das, A. K., & Dewanjee, S. (2018). Chapter 3 - Optimization of Extraction Using Mathematical Models and Computation. In S. D. Sarker, & L. Nahar (Eds.), *Computational Phytochemistry* (pp. 75-106). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-812364-5.00003-1
- Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B., & López-Fandiño, R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection. Journal of Food Protection*, 67, 1939-1944.
- De Angelis, M., Cassone, A., Rizzello, C. G., Gagliardi, F., Minervini, F., Calasso, M., . . . Gobbetti, M. (2010). Mechanism of Degradation of Immunogenic Gluten Epitopes from *Triticum turgidum* L. var. durum by Sourdough Lactobacilli and Fungal Proteases. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(2), 508-518. doi:10.1128/AEM.01630-09
- De Angelis, M., Rizzello, C. G., Fasano, A., Clemente, M. G., De Simone, C., Silano, M., . . . Gobbetti, M. (2006). VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for Celiac Sprue probiotics and gluten intolerance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1762, 80-93. doi:10.1016/j.bbadis.2005.09.008
- De Leon, A. C., Kidd, M. T., & Corzo, A. (2010). Box-Behnken Design: alternative multivariate design in broiler nutrition research. *World's Poultry Science Journal*, 66, 699-706.
- Decker, E. A., & Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 674-677.
- Delcour, J. A., Joye, I. J., Pareyt, B., Wilderjans, E., Brijs, K., & Lagrain, B. (2012). Wheat Gluten Functionality as a Quality Determinant in Cereal-Based Food Products. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 469-492.
- Deng, L., Wang, Z., Yang, S., Song, J., Que, F., Zhang, H., & Feng, F. (2016). Improvement of functional properties of wheat gluten using acid protease from *aspergillus usamii*. *PLoS One*, e0160101.
- Di Cagno, R., Barbato, M., Di Camillo, C., Rizzello, C. G., De Angelis, M., Giuliani, G., . . . Cucchiara, S. (2010). Gluten-free sourdough wheat baked goods appear safe for young celiac patients: a pilot study. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 51(6), 777-783. doi:10.1097/MPG.0b013e3181f22ba4
- Di Cagno, R., de Angelis, M., Lavermicocca, P., de Vincenzi, M., Giovannini, C., Faccia, M., & Gobbetti, M. (2002). Proteolysis by Sourdough Lactic Acid Bacteria: Effects on Wheat Flour Protein Fractions and Gliadin Peptides Involved in Human Cereal Intolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 623-633. doi:10.1128/AEM.68.2.623-633.2002
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23, 1473-1482. doi:10.1016/j.foodhyd.2008.08.005
- Divekar, M. T., Karunakaran, C., Rachid Lahlali, Kumar, S., Chelladurai, V., Liu, X., . . . Jayas, D. S. (2017). Effect of microwave treatment on the cooking and macronutrient qualities of pulses. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 409-422. doi:10.1080/10942912.2016.1163578
- Dørum, S., Qiao, S. W., Sollid, L. M., & Fleckenstein, B. (2009). A quantitative analysis of transglutaminase 2-mediated deamidation of gluten peptides: implications for the T-cell response in celiac disease. *Journal of Proteome Research*, 8(4), 1748-1755. doi:10.1021/pr800960n
- du Pré, M., & Sollid, L. M. (2015). T-cell and B-cell immunity in celiac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 29(3), 413-423. doi:10.1016/j.bpg.2015.04.001
- Dubat, A., & Boinot, N. (2012). *Mixolab Applications Handbook. Rheological and Enzymes Analyses*. Villeneuve, France: Chopin Technology.

- Dutta, P., Deb, A., & Majumdar, S. (2016). Optimization of the Medium for the Production of Extracellular Amylase by the *Pseudomonas stutzeri* ISL B5 Isolated from Municipal Solid Waste. *International Journal of Microbiology*. doi:10.1155/2016/4950743
- Edens, L., van der Hoeven, R., de Roos, A. L., & Harvey, M. (2005). *International patent Br. patenta WO 2005027953*.
- Ehren, J., Morón, B., Martin, E., Bethune, M., Gray, G. M., & Khosla, C. (2009). A foodgrade enzyme preparation with modest gluten detoxification properties. *PLoS ONE*, 4, e6313.
- Ekezie, F.-G. C., Sun, D.-W., & Cheng, J.-H. (2017). Acceleration of microwave-assisted extraction processes of food components by integrating technologies and applying emerging solvents: A review of latest developments. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 160-172. doi:10.1016/j.tifs.2017.06.006
- El Soda, M., & Dezmašaud, M. J. (1982). Les peptide-hydrolases des lactobacilles du groupe *Thermobacterium*. I. Mise en évidence de ces activités chez *Lactobacillus helveticus*, *L. acidophilus*, *L. lactis* et *L. bulgaricus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(10), 1181-1188.
- Elmalimadi, M. B., Jovanović, J. R., Stefanović, A. B., Tanasković, S. J., Đurović, S. B., Bugarski, B. M., & Knežević-Jugović, Z. D. (2017b). Controlled enzymatic hydrolysis for improved exploitation of the antioxidant potential of wheat gluten. *Industrial Crops and Products*, 109, 548-557.
- Elmalimadi, M. B., Stefanović, A. B., Šekuljica, N. Ž., Žuža, M. G., Luković, N. D., Jovanović, J. R., & Knežević-Jugović, Z. D. (2017a). The synergistic effect of heat treatment on alcalase-assisted hydrolysis of wheat gluten: Functional and antioxidant properties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41, e13207. doi:10.1111/jfpp.13207 762
- Eskin, N. M., & Shahidi, F. (2012). Chapter 1 - Cereals and Legumes. U *Biochemistry of foods* (3 izd., str. 4-48). Academic Press.
- FAO. (2015). CODEX STAN 118-1979 (2008). *Standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten*. Preuzeto 2019 sa <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/list-standards/en>
- FAO. (2022). *FAOSTAT Database 2022*. Preuzeto 1. 13., 2022 sa <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Ferreira, S., Bruns, R. E., da Silva, E., dos Santos, W., Quintella, C. M., David, J. M., . . . Neto, B. B. (2007). Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A*, 1158(1-2), 2-14. doi:10.1016/j.chroma.2007.03.051
- Frazer, A. C., Fletcher, R. F., Ross, C. A., Shaw, B., Sammons, H. G., & Schneider, R. (1959). Gluten-induced enteropathy. The effect of partially digested gluten. *The Lancet*, 274(7097), 252-255.
- Fucinos, C., Estevez, N., Míguez, M., Fajardo, P., Chapela, M. J., Gondar, D., & Rua, M. L. (2019). Effectiveness of proteolytic enzymes to remove gluten residues and feasibility of incorporating them into cleaning products for industrial purposes. *Food Research International*, 120, 167-177.
- Furlan, S. A., & Pant, H. K. (2006). General Properties. U A. Pandey, C. Webb, C. R. Soccol, & C. Larroche (Urednici), *Enzyme Technology* (str. 11-35). Springer, New York, NY. doi:10.1007/978-0-387-35141-4_2
- Garidel, P., & Schott, H. (2006). Fourier-transform midinfrared spectroscopy for analysis and screening of liquid protein formulations part 2: Detailed analysis and applications. *Bioprocess International*, 4(6), 48-55.
- Georgiev, S., & Dekova, T. (2011). Chapter 13 - Gluten: A Natural Biopolymer. U S. Kalia, & L. Avérous (Urednici), *Biopolymers* (str. 377-401). Scrivener Publishing LLC and Wiley. doi:10.1002/9781118164792.ch13
- Gianfrani, C., Mamone, G., la Gatta, B., Camarca, A., Di Stasio, L., Maurano, F., . . . Di Luccia, A. (2017). Microwave-based treatments of wheat kernels do not abolish gluten epitopes implicated in celiac disease. *Food and Chemical Toxicology*, 101, 105-113.

- Gianfrani, C., Siciliano, R. A., Facchiano, A. M., Camarca, A., Mazzeo, M. F., Costantini, S., . . . Rossi, M. (2007). Transamidation of Wheat Flour Inhibits the Response to Gliadin of Intestinal T Cells in Celiac Disease. *Gastroenterology*, *133*(3), 780-789. doi:10.1053/j.gastro.2007.06.023
- Glossary of Common and Scientific Names of Plants. (1990). U V. C. Baligar, & R. R. Duncan (Urednici), *Crops As Enhancers of Nutrient Use* (str. 545-549). Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-077125-7.50019-0
- Gobbetti, M., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., & De Angelis, M. (2007). Sourdough lactobacilli and celiac disease. *Food Microbiology*, *24*(2), 187-196. doi:10.1016/j.fm.2006.07.014
- Gomaa, E. Z. (2013). Optimization and characterization of alkaline protease and carboxymethyl-cellulase produced by *Bacillus pumillus* grown on *Ficus nitida* wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*(2), 529-537. doi:10.1590/S1517-83822013005000048
- Gujral, H. S., Sharma, B., & Khatri, M. (2018). Influence of replacing wheat bran with barley bran on dough rheology, digestibility and retrogradation behavior of chapatti. *Food Chemistry*, *240*, 1154-1160.
- Haboubi, N. Y., Taylor, S., & Jones, S. (2006). Coeliac disease and oats: a systematic review. *Postgraduate Medical Journal*, *82*, 672-678.
- Hadnađev, T. D. (2013). Uticaj dodatka emulgjućih skrobova na tehnološke karakteristike testa i kvalitet hleba. Republika Srbija: Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.
- Hadnađev, T. D., Torbica, A., & Hadnađev, M. (2011). Rheological properties of wheat flour substitutes/alternative crops assessed by Mixolab. *Procedia Food Science*, *1*, 328-334. doi:10.1016/j.profoo.2011.09.051
- Han, Z., Cai, M.-J., Cheng, J.-H., & Sun, D.-W. (2018). Effects of electric fields and electromagnetic wave on food protein structure and functionality: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *75*, 1-9.
- Hardt, N. A., Boom, R. M., & van der Goot, A. J. (2015). Starch facilitates enzymatic wheat gluten hydrolysis. *LWT - Food Science and Technology*, *61*, 557-563. doi:10.1016/j.lwt.2014.12.010
- Hausch, F., Shan, L., Santiago, N. A., Gray, G. M., & Khosla, C. (2002). Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, *283*, G996-G1003.
- Hu, R., Chen, G., & Li, Y. (2020). Production and Characterization of Antioxidative Hydrolysates and Peptides from Corn Gluten Meal Using Papain, Ficin, and Bromelain. *Molecules*, *25*(18), 4091. doi:10.3390/molecules25184091
- Hu, R., Xu, J., Qi, G., Wang, W., Sun, X. S., & Li, Y. (2022). Antioxidative hydrolysates from corn gluten meal may effectively reduce lipid oxidation and inhibit HepG2 cancer cell growth. *Journal of Agriculture and Food Research*, *7*, 100252. doi:10.1016/j.jafr.2021.100252
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Huan, Y.; Kong, Q.; Mou, H.; Yi, H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 582779.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 1841-1856.
- Huang, H. -W., Hsu, C. -P., Yang, B. B., & Wang, C. -Y. (2014). Potential Utility of High-Pressure Processing to Adress the Risk of Food Allergen Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*, 78-90.
- Husain, Q. (2010). Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *9*, 117-140. doi:10.1007/s11157-009-9184-9
- Ilić, N., Davidović, S., Milić, M., Rajilić-Stojanović, M., Pecarski, D., Ivancic-Santek, M., . . . Dimitrijević-Branković, S. (2022). Valorization of lignocellulosic wastes for extracellular enzyme production by novel Basidiomycetes: screening, hydrolysis, and bioethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery*. doi:10.1007/s13399-021-02145-x

- Immune Epitope Database and Analysis Resource*. (2022, 1 14). Preuzeto sa IEDB.org: Free epitope database and prediction resource: www.iedb.org
- Iwaniak, A., Hryniewicz, M., Minkiewicz, P., Bucholska, J., & Darewicz, M. (2020). Soybean (Glycine max) Protein Hydrolysates as Sources of Peptide Bitter-Tasting Indicators: An Analysis Based on Hybrid and Fragmentomic Approaches. *Applied Sciences*, *10*, 2514.
- Jakovetić Tanasković, S., Šekuljica, N., Jovanović, J., Gazikalović, I., Grbavčić, S., Dorđević, N., . . . Knežević-Jugović, Z. (2021). Upgrading of valuable food component contents and anti-nutritional factors depletion by solid-state fermentation: A way to valorize wheat bran for nutrition. *Journal of Cereal Science*, *99*, 103159. doi:10.1016/j.jcs.2020.103159
- Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, *121*, 178-184.
- Janssen, G., Christis, C., Kooy-Winkelaar, Y., Edens, L., Smith, D., van Veelen, P., & Koning, F. (2015). Ineffective Degradation of Immunogenic Gluten Epitopes by Currently Available Digestive Enzyme Supplements. *PLoS ONE*, *10*, e0128065.
- Jiang, H., Liu, Z., & Wang, S. (2018). Microwave processing: Effects and impacts on food components. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *58*(14), 2476-2489. doi:10.1080/10408398.2017.1319322
- Jovanović, J. R., Stefanović, A. B., Šekuljica, N. Ž., Tanasković, S. M., Dojčinović, M. B., Bugarski, B. M., & Knežević-Jugović, Z. D. (2016a). Ultrasound pretreatment as an useful tool to enhance egg white protein hydrolysis: kinetics, reaction model, and thermodynamics. *Journal of Food Science*, *81*(11), C2664-C2675.
- Jovanović, J. R., Stefanović, A. B., Žuža, M. G., Jakovetić, S. M., Šekuljica, N., Bugarski, B. M., & Knežević-Jugović, Z. D. (2016b). Improvement of antioxidant properties of egg white protein enzymatic hydrolysates by membrane ultrafiltration. *Hemijska Industrija*, *70*, 419-428.
- Joye, I. J., & McClements, D. J. (2014). Emulsifying and emulsion-stabilizing properties of gluten hydrolysates. *Journal of agricultural and food chemistry*, *62*(12), 2623-2630. doi:10.1021/jf5001343
- Karami, Z., Peighambaroust, S. H., Hesari, J., Akbari-Adergani, B., & Andreu, D. (2019). Antioxidant, anticancer and ACE-inhibitory activities of bioactive peptides from wheat germ protein hydrolysates. *Food Bioscience*, *32*, 100450. doi:10.1016/j.fbio.2019.100450
- Kehrer, J. P. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*(1), 43-50. doi:10.1016/S0300-483X(00)00231-6
- Kim, C. Y., Quarsten, H., Bergseng, E., Khosla, C., & Sollid, L. M. (2004). Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(12), 4175-4179. doi:10.1073/pnas.0306885101
- Knežević-Jugović, Z. D. (2008). *Enzimsko inženjerstvo*. Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet.
- Kong, X., Bao, S., Song, W., Hua, Y., Zhang, C., Chen, Y., & Li, X. (2021). Contributions of ethanol fractionation on the properties of vegetable protein hydrolysates and differences in the characteristics of metal (Ca, Zn, Fe)-chelating peptides. *LWT*, *146*, 111482. doi:10.1016/j.lwt.2021.111482
- Kong, X., Zhou, H., & Qian, H. (2007). Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, *102*, 759-763.
- Koning, F., Schuppan, D., Cerf-Bensussan, N., & Sollid, L. M. (2005). Pathomechanisms in celiac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, *19*(3), 373-387. doi:10.1016/j.bpg.2005.02.003
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). „Food-derived bioactive peptides - opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, *9*, 1297-1308.
- Krieg, N. R. (2005). Prokaryotic Domains. U D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, & G. M. Garrity (Urednici), *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Boston, MA: Springer. doi:10.1007/0-387-28021-9_3

- Kubota, K., Tanokura, M., & Takahashi, K. (2005). Purification and characterization of a novel prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger*. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 81(10), 447-453. doi:10.2183/pjab.81.447
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Lähdeaho, M. L., Kaukinen, K., Laurila, K., Vuotikka, P., Koivurova, O. P., Kärjä-Lahdensuu, T., . . . Mäki, M. (2014). Glutenase ALV003 attenuates gluten-induced mucosal injury in patients with celiac disease. *Gastroenterology*, 146, 1649-1658.
- Lamacchia, C., Baiano, A., Lamparelli, S., Notte, E. L., & Luccia, A. D. (2010). Changes in durum wheat kernel and pasta proteins induced by toasting and drying processes. *Food Chemistry*, 118(2), 191-198. doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.100
- Lamacchia, C., Di Luccia, A., & Gianfrani, C. (2013, April 29).
- Lamacchia, C., Landriscina, L., & D'Agnello, P. (2016). Changes in wheat kernel proteins induced by microwave treatment. *Food Chemistry*, 197, 634-640.
- Larhed, M., & Hallberg, A. (2001). Microwave-assisted high-speed chemistry: a new technique in drug discovery. *Drug discovery today*, 6(8), 406-416. doi:10.1016/s1359-6446(01)01735-4
- Lassissi, T. A., Hettiarachchy, N. S., Rayaprolu, S. J., Kannan, A., & Davis, M. (2014). Functional properties and Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of soy-whey proteins and fractions. *Food Research International*, 64, 598-602. doi:10.1016/j.foodres.2014.07.015
- Le, C., Fang, C., & Sekaran, S. (2017). Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, e02340-16.
- Lee, J., Koo, N., & Min, D. B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 3(1), 21-33.
- Leszczynska, J., Łacka, A., Szemraj, J., Lukamowicz, J., & Zegota, H. (2003). The effect of microwave treatment on the immunoreactivity of gliadin and wheat flour. *European Food Research and Technology*, 217(5), 387-391.
- Li, S., Zhang, R., Lei, D., Huang, Y., Cheng, S., Zhu, Z., . . . Cravotto, G. (2021). Impact of ultrasound, microwaves and high-pressure processing on food components and their interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 1-15. doi:10.1016/j.tifs.2021.01.017
- Li, X.-x., Han, L.-j., & Chen, L.-j. (2008). In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1660-1666. doi:10.1002/jsfa.3264
- Liu, C., & Ma, X. (2016). Primena mikrotalasne tehnike u organskoj hemiji i organskoj hemijskoj tehnologiji. *Primena mikrotalasne tehnike u organskoj hemiji i organskoj hemijskoj tehnologiji*, 70, 99-107. doi:10.1016/j.jcs.2016.05.018
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 265-275.
- Luo, Y., McLean, D., Linden, G., McAuley, D., McMullan, R., & Lundy, F. (2017). The naturally occurring host defense peptide, LL-37, and its truncated mimetics KE-18 and KR-12 have selected biocidal and antibiofilm activities against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* in vitro. *Frontiers in Microbiology*, 8, 544.
- Ma, S., Han, W., Li, L., Zheng, X., & Wang, X. (2019). The thermal stability, structural changeability, and aggregability of glutenin and gliadin proteins induced by wheat bran dietary fiber. *Food and Function*, 10, 172-179.
- MacArthur, L. A., & D'Appolonia, B. L. (1981). Effect of Microwave Radiation and Storage on Hard Red Spring Wheat Flour. *Cereal Chemistry*, 58(1), 53-56.
- Madhavan, A., Arun, K. B., Binod, P., Sirohi, R., Tarafdar, A., Reshmy, R., . . . Sindhu, R. (2021). Design of novel enzyme biocatalysts for industrial bioprocess: Harnessing the power of protein engineering, high throughput screening and synthetic biology. *Bioresource Technology*, 325, 124617. doi:10.1016/j.biortech.2020.124617

- Madhavan, A., Sindhu, R., Binod, P., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2017). Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. *Bioresource Technology*, *245*, 1304-1313. doi:10.1016/j.biortech.2017.05.031
- Mahroug, H., Ribeiro, M., Rhazi, L., Bentallah, L., Zidoune, M. N., Nunes, F. M., & Igrejas, G. (2019). How microwave treatment of gluten affects its toxicity for celiac patients? A study on the effect of microwaves on the structure, conformation, functionality and immunogenicity of gluten. *Food Chemistry*, *297*, 124986.
- Mahsa, M., & Elahe, A. (2014). Effects of pH changes on functional properties of native and acetylated wheat gluten. *International Food Research Journal*, *21*, 1183-1188.
- Makowski, M., Silva, Í., Do Amaral, C., Gonçalves, S., & Santos, N. (2019). Advances in lipid and metal nanoparticles for antimicrobial peptide delivery. *Pharmaceutics*, *11*, 588.
- Marston, R. M., & Welsh, S. O. (1980). Nutrient content of the national food supply. *National Food Review Winter Edition*.
- Martinez, M., Gómez-Cabellos, S., Giménez, M. J., Barro, F., Diaz, I., & Diaz-Mendoza, M. (2019). Plant Proteases: From Key Enzymes in Germination to Allies for Fighting Human Gluten-Related Disorders. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 721. doi:10.3389/fpls.2019.00721
- Matsuo, H., Morita, E., Tatham, A. S., Morimoto, K., Horikawa, T., Osuna, H., . . . Dekio, S. (2004). Identification of the IgE-binding epitope in omega-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(13), 12135-40. doi:10.1074/jbc.M311340200
- Matysiak-Budnik, T., Candalh, C., Cellier, C., Dugave, C., Namane, A., Vidal-Martinez, T., . . . Heyman, M. (2005). Limited Efficiency of Prolyl-Endopeptidase in the Detoxification of Gliadin Peptides in Celiac Disease. *Gastroenterology*, *129*, 786-796. doi:10.1053/j.gastro.2005.06.016
- Melini, F., & Melini, V. (2018). Immunological Methods in Gluten Risk Analysis: A Snapshot. *Safety*, *4*(4), 56. doi:10.3390/safety4040056
- Mendis, E., Rajapakse, N., & Kim, S. K. (2005). Antioxidant properties of a radical scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 581-587.
- Mijin, D. Ž., & Petrović, S. D. (2005). Primena mikrotalasne tehnike u organskoj hemiji i organskoj hemijskoj tehnologiji. *Hemijska industrija*, *59*(9-10), 224-229.
- Mirmoghtadaie, L., Aliabadi, S. S., & Hosseini, S. M. (2016). Recent approaches in physical modification of protein functionality. *Food Chemistry*, *199*, 619-627. doi:10.1016/j.foodchem.2015.12.067
- Miyazono, K. I., Kubota, K., Takahashi, K., & Tanokura, M. (2022). Crystal structure and substrate recognition mechanism of the prolyl endoprotease PEP from *Aspergillus niger*. *Biochemical and biophysical research communications*, *591*, 76-81. doi:10.1016/j.bbrc.2021.12.114
- Mohan Kumar, B. V., Sarabhai, S., & Prabhasankar, P. (2019). Targeted degradation of gluten proteins in wheat flour by prolyl endoprotease and its utilization in low immunogenic pasta for gluten sensitivity population. *Journal of Cereal Science*, *87*, 59-67. doi:10.1016/j.jcs.2019.03.001
- Mojović, L. (2008). *Farmaceutska biotehnologija*. Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet. Univerzitet u Beogradu.
- Murray, C., Ikuta, K., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., . . . Lancet, e. a. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet*, *399*, 629-655. doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Nilsen, E. M., Lundin, K. E., Krajci, P., Scott, H., Sollid, L. M., & Brandtzaeg, P. (1995). Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma. *Gut*, *37*(6), 766-776. doi:10.1136/gut.37.6.766

- Onipe, O. O., Jideani, A., & Beswa, D. (2015). Composition and functionality of wheat bran and its application in some cereal food products. *International Journal of Food Science and Technology*, *50*, 2509-2518. doi:10.1111/ijfs.12935
- Osborne, T. B. (1895). The proteins of barley. *Journal of the American Chemical Society*, *17*, 539-567.
- Osorio, C. E., Wen, N., Mejías, J. H., Mitchell, S., von Wettstein, D., & Rustgi, S. (2020). Directed-Mutagenesis of *Flavobacterium meningosepticum* prolyl-oligopeptidase and a glutamine-specific endopeptidase from barley. *Frontiers in Nutrition*, *7*, 11.
- Pandey, A., & Ramachandran, S. (2006). General Introduction. U A. Pandey, C. Webb, C. R. Soccol, & C. Larroche (Urednici), *Enzyme Technology* (str. 1-10). Springer New York, NY. doi:10.1007/978-0-387-35141-4_1
- Panozzo, A., Manzocco, L., Lippe, G., & Nicoli, M. C. (2016). Effect of pulsed light on structure and immunoreactivity of gluten. *Food chemistry*, *194*, 366–372. doi:10.1016/j.foodchem.2015.08.042
- Park, E. Y., Imazu, H., Matsumura, Y., Nakamura, Y., & Sato, K. (2012). Effects of Peptide Fractions with Different Isoelectric Points from Wheat Gluten Hydrolysates on Lipid Oxidation in Pork Meat Patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(30), 7483-7488.
- Pazinatto, C., Gomes Malta, L., Pastore, G. M., & Netto, F. M. (2013). Antioxidant capacity of amaranth products: effects of thermal and enzymatic treatments. *Food Science and Technology*, *33*(3), 485-493. doi:10.1590/S0101-20612013005000076
- Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1979). Emulsifying properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *26*, 716-723.
- Pereira, M. A., O'Reilly, E., Augustsson, K., Fraser, G. E., Goldbourt, U., Heitmann, B. L., . . . Ascherio, A. (2004). Dietary Fiber and Risk of Coronary Heart Disease: A Pooled Analysis of Cohort Studies. *Archives of internal medicine*, *164*(4), 370-376. doi:10.1001/archinte.164.4.370. PMID: 14980987
- Plugis, N. M., & Khosla, C. (2015). Therapeutic approaches for celiac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, *29*(3), 503-521. doi:10.1016/j.bpg.2015.04.005
- Pourmohammadi, K., & Abedi, E. (2021). Enzymatic modifications of gluten protein: Oxidative enzymes. *Food Chemistry*, *356*, 129679.
- Pownall, T. L., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2010). Amino Acid Composition and Antioxidant Properties of Pea Seed (*Pisum sativum* L.) Enzymatic Protein Hydrolysate Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(8), 4712-4718. doi:10.1021/jf904456r
- Preichardt, L. D., & Gularte, M. A. (2013). Gluten Formation: Its Sources, Composition and Health Effects. U D. B. Walter (Ur.), *Gluten* (str. 55-70). New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Qian, Z. J., Jung, W. K., & Kim, S. K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresource Technology*, *99*, 1690-1698.
- Qu, C., Wang, H., Liu, S., Wang, F., & Liu, C. (2017). Effects of microwave heating of wheat on its functional properties and accelerated storage. *Journal of food science and technology*, *54*(11), 3699–3706. doi:10.1007/s13197-017-2834-y
- Quarsten, H., Molberg, O., Fugger, L., McAdam, S. N., & Sollid, L. M. (1999). HLA binding and T cell recognition of a tissue transglutaminase-modified gliadin epitope. *European Journal of Immunology*, *29*(8), 2506-2514.
- Rai, S., Kaur, A., & Chopra, C. S. (2018). Gluten-free products for celiac susceptible people. *Frontiers in Nutrition*, *5*, 116.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *16*, 562-569.
- Rallabhandi, P., Sharma, G. M., Pereira, M., & Williams, K. M. (2015). Immunological Characterization of the Gluten Fractions and Their Hydrolysates from Wheat, Rye and Barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 1825-1832. doi:10.1021/jf505716p

- Ratledge, C., & Kristiansen, B. (2001). *Basic Biotechnology* (2 ed.). Cambridge University Press.
- Reddy, N., Jiang, Q., & Yang, Y. (2011). Novel wheat protein films as substrates for tissue engineering. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 22(15), 2063-2077. doi:10.1163/092050610X532638
- Ren, G., & Cheng, F. (1998). Drying of American ginseng (*Panax quinquefolium*) roots by microwave-hot air combination. *Journal of Food engineering*, 35(4), 433-443. doi:10.1016/s0260-8774(98)00030-2
- Ribeiro, M., Nunes, F. M., Rodrigez-Quijano, M., Carrillo, J. M., Branlard, G., & Igrejas, G. (2018). Next-generation therapies for celiac disease: The gluten-targeted approaches. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 56-71. doi:10.1016/j.tifs.2018.02.021
- Rizzello, C. G., De Angelis, M., Di Cagno, R., Camarca, A., Silano, M., Losito, I., . . . Gobbetti, M. (2007). Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Applied and environmental microbiology*, 73(14), 4499-4507. doi:10.1128/AEM.00260-07
- Sajjad, A., Zia, M., Xiao, X., Olsson, R. T., Capezz, A. J., & Rasheed, F. (2023). Wheat gluten hydrolysates with embedded Ag-nanoparticles; a structure-function assessment for potential applications as wound sorbents with antimicrobial properties. *Polymer Testing*, 118, 107896. doi:10.1016/j.polymertesting.2022.107896
- Salim, A. A., Grbavčić, S., Šekuljica, N., Stefanović, A., Jakovetić Tanasković, S., Luković, N., & Knežević-Jugović, Z. (2017). Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp. TMF-1 in solid state fermentation on agricultural by-products: The evaluation of substrate pretreatment methods. *Bioresource Technology*, 228, 193-200. doi:10.1016/j.biortech.2016.12.081
- Sandhya, C., Sumantha, A., & Pandey, A. (2006). Proteases. U A. Pandey, C. Webb, C. R. Soccol, & C. Larroche (Urednici), *Enzyme Technology* (str. 319–332). Springer, New York, NY. doi:10.1007/978-0-387-35141-4_16
- Sapone, A., Catassi, C., Fasano, A., Bai, J. C., Ciacci, C., Dolinsek, J., . . . Volta, U. (2012). Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Medicine*, 10, 13.
- Scherf, K. A., Koehler, P., & Wieser, H. (2016). Gluten and wheat sensitivities - An overview. *Journal of Cereal Science*, 67, 2-11. doi:10.1016/j.jcs.2015.07.008
- Scherf, K. A., Wieser, H., & Koehler, P. (2018). Novel approaches for enzymatic gluten degradation to create high-quality gluten-free products. *Food Research International*, 110, 62-72. doi:10.1016/j.foodres.2016.11.021
- Schmiele, M., Felisberto, M. H., Clerici, M. T., & Chang, Y. K. (2017). Mixolab™ for rheological evaluation of wheat flour partially replaced by soy protein hydrolysate and fructooligosaccharides for bread production. *LWT - Food Science and Technology*, 76, Part B, 259-269. doi:10.1016/j.lwt.2016.07.014
- Segura, V., Ruiz-Carnicer, Á., Sousa, C., & de Lourdes Moreno, M. (2021). New Insights into Non-Dietary Treatment in Celiac Disease: Emerging Therapeutic Options. *Nutrients*, 13, 2146.
- Shan, L., Marti, T., Sollid, L. M., Gray, G. M., & Khosla, C. (2004). Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *The Biochemical journal*, 383, 311-318. doi:10.1042/BJ20040907
- Shan, L., Molberg, Ø., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., . . . Khosla, C. (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 297, 2275-2279. doi:10.1371/journal.pone.0024455
- Sharma, G. M., Rallabhandi, P., Williams, K. M., & Pahlavan, A. (2016). Characterization of Antibodies for Grain-Specific Gluten Detection. *Journal of Food Science*, 81, T810-T816. doi:10.1111/1750-3841.13241
- Shewry, P. R., & Halford, N. G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 53, 947-958.

- Shewry, P. R., D'Ovidio, R., Lafiandra, D., Jenkins, J. A., Mills, E. N., & Békés, F. (2009). CHAPTER 8 - Wheat Grain Proteins. U K. Khan, & P. R. Shewry (Urednici), *Wheat (Fourth Edition)* (str. 223-298). AACC International Press. doi:10.1016/B978-1-891127-55-7.50015-X
- Shewry, P. R., Tatham, A. S., Forde, J., Kreis, M., & Mifflin, B. J. (1986). The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. *Journal of Cereal Science*, 4(2), 97-106. doi:10.1016/S0733-5210(86)80012-1
- Shimada, K., & Cheftel, J. C. (1988). Determination of sulfhydryl groups and disulfide bonds in heat-induced gels of soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 147-153.
- Singh, H., & MacRitchie, F. (2004). Changes in proteins induced by heating gluten dispersions at high temperature. *Journal of Cereal Science*, 39, 297-301.
- Singh, P., Arora, A., Strand, T. A., Leffler, D. A., Catassi, C., Green, P. H., . . . Makharia, G. K. (2018). Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 16(6), 823-836.e2.
- Slavin, J. (2004). Whole grains and human health. *Nutrition Research Reviews*, 17(1), 99-110. doi:10.1079/NRR200374
- Snyder, H., & Kwon, T. (1987). Nutritional attributes of soybeans and soybean products. In Soybean Utilization. U *Soybean Utilization* (str. 187-217). Van Nostrand Reinhold Company Inc. New York.
- Socha, P., Mickowska, B., Urminska, D., & Kačmárová, K. (2015). THE USE OF DIFFERENT PROTEASES TO HYDROLYZE GLIADINS. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4(2), 101-104. doi:10.15414/jmbfs.2015.4.special2.101-104
- Sollid, L. M., Qiao, S. W., Anderson, R. P., Gianfrani, C., & Koning, F. (2012). Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics*, 64, 455-460. doi:10.1007/s00251-012-0599-z
- Sollid, L. M., Tye-Din, J. A., Qiao, S. W., Anderson, R. P., Gianfrani, C., & Koning, F. (2020). Update 2020: nomenclature and listing of celiac disease-relevant gluten epitopes recognized by CD4+ T cells. *Immunogenetics*, 72, 85-88. doi:10.1007/s00251-019-01141-w
- Standards | CODEXALIMENTARIUS FAO-WHO.* (n.d.). Preuzeto 8. 12., 2018. sa http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcode%252Fstandards%252FCODEX%252FBSTAN%252B118-1979%252FCXS_118e_2015.pdf
- Stefanović, A. B., Jovanović, J. R., Balanč, B. D., Šekuljica, N. Ž., Jakovetić Tanasković, S. M., Dojčinović, M. B., & Knežević-Jugović, Z. D. (2018). Influence of ultrasound probe treatment time and protease type on functional and physicochemical characteristics of egg white protein hydrolysates. *Poultry Science*, 97, 2218-2229.
- Stefanović, A. B., Jovanović, J. R., Grbavčić, S. Ž., Šekuljica, N. Ž., Manojlović, V. B., Bugarski, B. M., & Knežević-Jugović, Z. D. (2014). Impact of ultrasound on egg white proteins as a pretreatment for functional hydrolysates production. *European Food Research and Technology*, 239, 979-993.
- Stoven, S., Murray, J. A., & Marietta, E. (2012). Celiac Disease: Advances in Treatment via Gluten Modification. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 10(8), 859-862.
- Stressler, T., Eisele, T., Baur, C., Wangler, J., Kuhn, A., & Fischer, L. (2015). Extracellular peptidases from insect- and compost-associated microorganisms: screening and usage for wheat gluten hydrolysis. *European Food Research and Technology*, 241, 263-274. doi:10.1007/s00217-015-2452-8
- Sugai, E., Vázquez, H., Nachman, F., Moreno, M. L., Mazure, R., Smecuol, E., . . . Bai, J. C. (2006). Accuracy of Testing for Antibodies to Synthetic Gliadin-Related Peptides in Celiac Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4(9), 1112-1117. doi:10.1016/j.cgh.2006.05.004
- Surget, A., & Barron, C. (2005). Histologie du grain de blé. *Industrie des Céréales*, 145, 3-7.

- Švec, I., & Hrušková, M. (2015). The Mixolab parameters of composite wheat/hemp flour and their relation to quality features. *LWT Food Science and Technology*, *60*, 623-629. doi:10.1016/j.lwt.2014.07.034
- Talapko, J., Meštrović, T., Juzbašić, M., Tomas, M., Erić, S., Horvat Aleksijević, L., . . . Škrlec, I. (2022). Antimicrobial Peptides—Mechanisms of Action, Antimicrobial Effects and Clinical Applications. *Antibiotics*, *11*, 1417. doi:10.3390/antibiotics11101417
- Tang, C. H., Peng, J., Zhen, D. W., & Chen, Z. (2009). Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, *115*, 672-678.
- Thompson, T. (2000). Questionable foods and the gluten-free diet: Survey of the current 4 recommendations. *Journal of the American Dietetic Association*, *100*, 463-465.
- Thostenson, E. T., & Chou, T.-W. (1999). Microwave processing: fundamentals and applications. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, *30*(9), 1055-1071. doi:10.1016/S1359-835X(99)00020-2
- Tollefsen, S., Arentz-Hansen, H., Fleckenstein, B., Molberg, O., Raki, M., Kwok, W. W., . . . Sollid, L. M. (2006). HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *116*, 2226-2236. doi:10.1172/JCI27620
- Topping, D. (2007). Cereal complex carbohydrates and their contribution to human health. *Journal of Cereal Science*, *46*, 220-229.
- Torbica, A., Hadnađev, M., Dokić, P., & Sakač, M. (2008). Mixolab profiles of gluten free products ingredients. *Food Processing, Quality and Safety*, *35*(1), 19-26.
- Torres, M. D., Sothiselvam, S., Lu, T. K., & Fuente-Nunez, C. d. (2019). Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. *Journal of Molecular Biology*, *431*(18), 3547-3567. doi:10.1016/j.jmb.2018.12.015
- Tovoli, F., Masi, C., Guidetti, E., Negrini, G., Paterini, P., & Bolondi, L. (2015). Clinical and diagnostic aspects of gluten related disorders. *World journal of clinical cases*, *3*(3), 275-284. doi:10.12998/wjcc.v3.i3.275
- Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J., & Khrestchatsky, M. S. (2011). Synthetic therapeutic peptides: Science and market. *Drug Discov. Today*, *15*, 40-56.
- Vukašinović-Sekulić, M. (2013). *Mikrobiologija*. Beograd: Tehnološko-Metalurški fakultet.
- Walde, S., Balaswamy, K., Velu, V., & Rao, D. (2002). Microwave drying and grinding characteristics of wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Food Engineering*, *55*(3), 271-276. doi:10.1016/S0260-8774(02)00101-2
- Walsh, G. (2002). *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*. England: Wiley.
- Walter, T., Wieser, H., & Koehler, P. (2014). Production of gluten-free wheat starch by peptidase treatment. *Journal of Cereal Science*, *60*(1), 202-209. doi:10.1016/j.jcs.2014.02.012
- Walter, T., Wieser, H., & Koehler, P. (2015). Degradation of gluten in rye sourdough products by means of a proline-specific peptidase. *European Food Research and Technology*, *240*, 517-524. doi:10.1007/s00217-014-2350-5
- Wang, C. H., & Damodaran, S. (1990). Thermal destruction of cysteine and cystine residues of egg protein under conditions of gelation. *Journal of Food Science*, *55*, 1077-1080.
- Wang, M., Si, T., & Zhao, H. (2012). Biocatalyst development by directed evolution. *Bioresource Technology*, *15*, 117-125. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.054
- Wang, Y., Li, Z., Li, H., & Selomulya, C. (2022). Effect of hydrolysis on the emulsification and antioxidant properties of plant-sourced proteins. *Current Opinion in Food Science*, *48*, 100949. doi:https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100949
- Wang, Y.-Y., Wang, C.-Y., Wang, S.-T., Li, Y.-Q., Mo, H.-Z., & He, J.-X. (2021). Physicochemical properties and antioxidant activities of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed protein hydrolysates obtained with different proteases. *Food Chemistry*, *345*, 128765. doi:10.1016/j.foodchem.2020.128765

- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y., & Ma, H. (2020). Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *105*, 308-322. doi:10.1016/j.tifs.2020.09.019
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, *24*, 115-119. doi:10.1016/j.fm.2006.07.004
- Wieser, H. (2008). Detection of gluten. U E. K. Arendt, & F. Dal Bello (Urednici), *Gluten-Free Cereal Products and Beverages* (str. 47-80). Cambridge, MA, USA: Academic Press.
- Wieser, H., & Koehler, P. (2008). The Biochemical Basis of Celiac Disease. *Cereal Chemistry*, *85*(1), 1-13. doi:10.1094/CCHEM-85-1-0001
- Wieser, H., & Koehler, P. (2012). Detoxification of Gluten by Means of Enzymatic Treatment. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, *95*, 356-363. doi:10.5740/jaoacint.SGE_Wieser
- Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B., & Yongsawadigul, J. (2012). Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. *Food Chemistry*, *132*(1), 104-111. doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.040
- Woo, K. S., Kim, H. Y., Hwang, I. G., Lee, S. H., & Jeong, H. S. (2015). Characteristics of the thermal degradation of glucose and maltose solutions. *Preventive Nutrition and Food Science*, *20*, 102-109.
- World Health Organization. (2015). *CODEX STAND 118-1979*.
- Wouters, A. G., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K., Blecker, C., Delcour, J. A., & Murray, B. S. (2018). Foaming and air-water interfacial characteristics of solutions containing both gluten hydrolysate and egg white protein. *Food Hydrocolloids*, *77*, 176-186.
- Wrigley, C. W., & Bietz, J. A. (1988). Proteins and amino acids. U Y. Pomeranz (Ur.), *Wheat - Chemistry and Technology* (T. 1, str. 159-275). St Paul, MN: American Association of Cereal Chemistry.
- Xiang, S., Zou, H., Liu, Y., & Ruan, R. (2020). Effects of microwave heating on the protein structure, digestion properties and Maillard products of gluten. *Journal of Food Science and Technology*, *57*, 2139-2149.
- Yadav, D., Anand, T., Kaur, J., & Singh, A. K. (2012). Improved Storage Stability of Pearl Millet Flour Through Microwave Treatment. *Improved Storage Stability of Pearl Millet Flour Through Microwave Treatment*, *1*, 399-404. doi:10.1007/s40003-012-0040-8
- Yalcin, E., Sakiyan, O., Sumnu, G., Celik, S., & Koksel, H. (2008). Functional properties of microwave treated gluten. *European Food Research and Technology*, *227*, 1411-1417.
- Yang, X., Li, Y., Li, S., Oladejo, A. O., Wang, Y., Huang, S., . . . Ye, X. (2017). Effects of multi-frequency ultrasound pretreatment under low power density on the enzymolysis and the structure characterization of defatted wheat germ protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, *38*, 410-420.
- Zamakhchari, M., Wei, G., Dewhurst, F., Lee, J., Schuppan, D., Oppenheim, F. G., & Helmerhorst, E. J. (2011). Identification of Rothia Bacteria as Gluten-Degrading Natural Colonizers of the Upper Gastro-Intestinal Tract. *PLoS ONE*, *6*(9), e24455.
- Zhang, Q., Tong, X., Sui, X., Wang, Z., Qi, B., Li, Y., & Jiang, L. (2018). Antioxidant activity and protective effects of Alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Food Research International*, *256-264*. doi:10.1016/j.foodres.2018.05.046
- Zhang, Y., Deng, L., Zhong, H., Pan, J., Li, Y., & Zhang, H. (2020). Superior water stability and antimicrobial activity of electrospun gluten nanofibrous films incorporated with glycerol monolaurate. *Food Hydrocolloids*, *109*, 106116. doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106116
- Zhang, Y., He, S., & Simpson, B. K. (2018). Enzymes in food bioprocessing—novel food enzymes, applications, and related techniques. *Current Opinion in Food Science*, *19*, 30-35. doi:10.1016/j.cofs.2017.12.007
- Zhang, Y., Li, J., Li, S., Ma, H., & Zhang, H. (2018). Mechanism study of multimode ultrasound pretreatment on the enzymolysis of wheat gluten. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *98*, 1530-1538.

- Zhang, Z., Chen, X., Liu, X., Liu, W., Liu, Q., Huang, J., & Hu, L. Z. (2022). Effect of salt ions on mixed gels of wheat gluten protein and potato isolate protein. *LWT*, *154*, 112564. doi:10.1016/j.lwt.2021.112564
- Zhu, K.-X., Su, C.-Y., Guo, X.-N., Peng, W., & Zhou, H.-M. (2011). Influence of ultrasound during wheat gluten hydrolysis on the antioxidant activities of the resulting hydrolysate. *International Journal of Food Science & Technology*, *46*, 1053-1059. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02585.x
- Žilić, S. (2013). Wheat Gluten: Composition and Health Effects. U D. B. Walter (Ur.), *Gluten: Sources, Composition and Health Effects* (str. 71-86). New York: Nova Science Publishers Inc.

12. Spisak slika

Slika 3.1.1. Uzdužni i poprečni presek pšeničnog zrna (izvor i prevedeno na srpski, (Arendt & Zannini, 2013)).	8
Slika 4.1.1 Mehanizam nastanka imunog odgovora u tankom crevu usled prolaska peptida glutena (Ribeiro, et al., 2018; Briani, Samaroo, & Alaedini, 2008; Stoven, Murray, & Marietta, 2012) (slika kreirana u programu BioRender; „Created with BioRender.com”).	13
Slika 6.1.1. Box-Behnken eksperimentalni dizajn.	22
Slika 7.1.1. Primer Mixolab® krive pšeničnog brašna analiziranog pri standardnom Chopin+ protokolu (masa testa 75g, brzina mešanja 80 rpm).	24
Slika 8.2.1. Šematski prikaz proizvodnje enzima za razgradnju glutena.	29
Slika 8.2.2. Prikaz standardne prave metodom po Loriju.	31
Slika 8.2.3. Šematski prikaz mikrotalasnog tretmana u uređaju Anton Paar 300, viala G30.	32
Slika 8.2.4. Šematski prikaz postupka hidrolize glutena sa i bez mikrotalasnog pretretmana (slika kreirana u programu BioRender; „Created with BioRender.com”).	33
Slika 8.2.5. Šematski prikaz izvođenja kompetitivnog ELISA testa (slika kreirana u programu BioRender; „Created with BioRender.com”).	35
Slika 8.2.6. Šematski prikaz pripreme ABTS radikal katjona i njegova reakcija obezbojavanja sa antioksidansom.	36
Slika 8.2.7. a) Atomi azota u ferozinu koji reaguju sa Fe^{2+} , pri čemu formiraju kompleks ljubičastog obojenja, b) Antioksidativno sredstvo sprečava formiranje kompleksa Fe^{2+} -ferozin. ...	37
Slika 8.2.8 Mehanizam redukcije DPPH [·] radikala do DPPH-H pomoću antioksidansa (donora atoma H).	38
Slika 8.2.9. Uređaj za merenje naelektrisanja i veličine čestica Zetasizer (Malvern Instruments).	40
Slika 8.2.10. Šematski prikaz postupka razdvajanja frakcija hidrolizata glutena pomoću celuloznih membrana različitih veličina pora (1-30 kDa) (slika kreirana u programu BioRender; „Created with BioRender.com”).	42
Slika 9.1.1. a) Rast <i>B. subtilis</i> TMF-1 na agarnoj ploči sa glutenom; b) mikroskopski prikaz <i>B. subtilis</i> TMF-1.	44
Slika 9.2.1. Preliminarne enzimске hidrolize glutena iz pšenice pomoću Alkalaze. Ispitane su tri različite koncentracije supstrata (1–10% (w/w)) i tri različita enzim-supstrat odnosa (E/S 1–10%). Reakcioni uslovi: 60 °C, pH 8, 200 o/min.	48
Slika 9.3.1. Relativni sadržaj glutena (%) nakon a) mikrotalasnog pretretmana pšeničnog glutena pri različitim snagama mikrotalasa (200–800 W); b) toplotno tretiranog pšeničnog glutena na različitim temperaturama (50–100 °C); c) mikrotalasno tretiranog glutena pri snazi od 200 W na različitim temperaturama (50–100 °C). Svi uzorci su poređeni sa netretiranim uzorkom glutena, koji se smatrao kontrolnim uzorkom (100%). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=2). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima na istoj slici su statistički značajno različite (p < 0,05).	50
Slika 9.3.2. Uzorci glutena nakon mikrotalasnog tretmana (200–800 W).	50
Slika 9.3.3. Sadržaj ukupnih i reaktivnih SH grupa izmerenih nakon: a) mikrotalasnog tretmana pšeničnog glutena primenom različitih snaga mikrotalasa (200–800 W); b) toplotnog tretmana pšeničnog glutena na različitim temperaturama (50–100 °C); c) mikrotalasno tretiranog pšeničnog glutena pri snazi od 200 W na različitim temperaturama (50–100 °C). Svi uzorci su mereni pri istom sadržaju proteina, 2 mg/ml. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima na istoj slici su statistički značajno različite (p < 0,05).	52
Slika 9.4.1. Poređenje učinkovitosti različitih mikrotalasnih pretretmana na proteine glutena i podložnosti tako tretiranih uzoraka enzimskoj hidrolizi komercijalnom enzimskom proteazom, Alkalazom. Eksperimentalni rezultati fitovani su kinetičkim modelom nultog reda koji pretpostavlja inhibiciju supstrata i inaktivaciju enzima. Reakcioni uslovi za postupak hidrolize predstavljenih krivih	

su: koncentracija glutena 2% (w/w), E/S odnos 5%, temperatura reakcije 60 °C i pH 8,0. Umetnuta tabela – vrednosti kinetičkih konstanti za enzimsku hidrolizu mikrotalasno pretretiranog glutena. .	55
Slika 9.4.2. a) Relativni sadržaj glutena (%) kontrolnog hidrolizata glutena i mikrotalasno pretretiranih hidrolizata glutena (MTH) (200–800 W) (Alkalaza, pH 8,0, 60 °C) u poređenju sa netretiranim glutenom (100%) i b) profil smanjenja sadržaja glutena (g/kg) tokom enzimske hidrolize, kontrolna i MTH 200 W. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=2). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima na istoj slici su statistički značajno različite (p < 0,05).	56
Slika 9.4.3. a) Profili i stepeni hidrolize (DH, %) pšeničnog brašna u funkciji vremena hidrolize i b) promena srednje dužine peptidnih lanaca (APCL) tokom hidrolize. Reakcioni uslovi hidrolize: enzim Alkalaza, pH 8,0, T 60 °C, koncentracija supstrata 5,0-20,0%, E/S odnos 5%.....	57
Slika 9.4.4. Tok enzimske hidrolize glutena enzimom Pronaza.	59
Slika 9.5.1. Dekonvolucija pika amid I regije (1,700–1,600 cm ⁻¹) proteina glutena u FTIR spektru a) bez pretretmana i sa pretretmanom mikrotalasima snage b) 200 W, c) 400 W, d) 600 W i e) 800 W pomoću funkcija „Peak and Baseline“ (podešavanje bazne linije, dekonvolucija, drugi izvod i metoda fitovanja podataka po Gausu) u programu OriginPro Lab 9.0.....	61
Slika 9.5.2. Dekonvolucija pika amid I regije (1,700–1,600 cm ⁻¹) hidrolizata proteina glutena u FTIR spektru a) bez pretretmana i sa pretretmanom mikrotalasima snage b) 200 W, c) 400 W, d) 600 W i e) 800 W pomoću funkcija „Peak and Baseline“ (podešavanje bazne linije, dekonvolucija, drugi izvod i metoda fitovanja podataka po Gausu) u programu OriginPro Lab 9.0.	62
Slika 9.5.3. SDS-PAGE profili proteinskih frakcija glutena, mikrotalasno tretirani gluten pri različitim snagama mikrotalasa (200–800 W), kontrolna hidroliza glutena i mikrotalasno pretretirani hidrolizat glutena (200W). (a) Traka: I— standard proteina, II—MT 200 W, III—MT 400 W, IV—MT 600 W, V—MT 800 W, VI—Gluten, VII— GK, VIII—MTH 200 W, IX—Gluten, X— standard proteina; (b) Traka: I— standard proteina, II—Gluten, III—GK, IV—GK – 45 min, V— GK – 90 min, VI— GK – 135 min, VII—GHMT , VIII— GHMT – 45 min, IX— GHMT – 90 min, X— GHMT – 135 min.....	64
Slika 9.5.4. Raspodela veličina čestica hidrolizata glutena a) netretirani (GK, kontrolna hidroliza) i b) mikrotalasno pretretirani hidrolizat glutena (GHMT); Alkalaza, pH 8,0, T 60°C.....	64
Slika 9.5.5. Zeta potencijal (mV) hidrolizata glutena a) netretirani (GK, kontrolna hidroliza) i b) mikrotalasno pretretirani hidrolizat glutena (GHMT); Alkalaza, pH 8,0, T 60°C.	65
Slika 9.5.6. RP-HPLC hromatografski profili netretiranog i mikrotalasno pretretiranog (200W) hidrolizata glutena.	66
Slika 9.5.7. FTIR spektar a) amid I regije (1700–1600 cm ⁻¹) i b) amid II (1700–1600 cm ⁻¹) i amid II regije (1480–1575 cm ⁻¹) sirovog brašna (B) i hidrolizata brašna (HB)(Reakcioni uslovi enzimske hidrolize: koncentracija supstrata 5-15%, enzim Alkalaza, E/S odnos 5%, pH 8, T 60°C).	67
Slika 9.5.8. Dekonvolucija spektra amid I trake (1,700–1,600 cm ⁻¹) FTIR spektra proteina glutena poreklom iz brašna (B) i hidrolizata proteina brašna (HB): a) sirovo brašno (kontrola), b) HB 5% (w/w), c) HB 10% (w/w), d) HB 15% (w/w).	68
Slika 9.5.9. Dekonvolucija spektra amid I trake (1,700–1,600 cm ⁻¹) FTIR spektra proteina glutena poreklom iz hidrolizata proteina brašna (HB): a) HB 15% (w/w) – 15 min, b) HB 15% (w/w) – 30 min, c) HB 15% (w/w) – 45 min, d) HB 15% (w/w).....	69
Slika 9.5.10. Elektroforetski profil proteinskih frakcija sirovog brašna i hidrolizata proteina brašna. Traka I – gluten, II i III – standard proteina, IV – sirovo brašno, V – HB 5% (w/w), VI – HB 10% (w/w), VII – HB 15% (w/w), VIII – HB 15% (w/w) – 15 min, IX – HB 15% (w/w) – 30 min, X – HB 15% (w/w) – 45 min.	70
Slika 9.5.11. a) Raspodela veličina čestica brašna (B) i hidrolizata proteina brašna (HB) i b) Zeta potencijal brašna (B) i hidrolizata proteina brašna (HB). Reakcioni uslovi hidrolize: Alkalaza, 5% E/S, pH 8,0, 60°C).	71
Slika 9.5.12. RP-HPLC hromatografski profili hidrolizata glutena iz brašna.	72

Slika 9.5.13. Dekonvolucija spektra amid I trake (1700–1600 cm ⁻¹) FTIR spektra hidrolizata proteina glutena dobijenih pomoću enzima Pronaza (50 °C, pH 8).	73
Slika 9.5.14. Elektroforetski profil hidrolizata glutena enzimom Pronaza. S– standardi, G – gluten, P 1–10 – hidrolizati Pronazom.....	74
Slika 9.5.15. a) Zeta potencijal hidrolizata glutena Pronazom i b) raspodela veličina čestica hidrolizata glutena Pronazom.....	75
Slika 9.5.16. RP-HPLC hromatografski profili hidrolizata glutena Pronazom.	76
Slika 9.6.1. Antioksidativne aktivnosti frakcija hidrolizata glutena i mikrotalasno pretretiranog (200 W) hidrolizata glutena: a) ABTS (%), b) MICA (%) i d) DPPH (%).	81
Slika 9.6.2. Antioksidativne aktivnosti ABTS (%), MICA (%) i DPPH (%) sirovog brašna i hidrolizata proteina brašna (Alkalaza, pH 8,0, T 60°C). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima u istoj koloni su statistički značajno različite (p < 0,05).	84
Slika 9.6.3. Indeksi emulgujuće aktivnosti (EAI) i emulzione stabilnosti (ESI) hidrolizata glutena Pronazom. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=2). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima u istoj seriji merenja su statistički značajno različite (p < 0,05).	87
Slika 9.6.4. Kapacitet (FC) i stabilnost (FS) pene hidrolizata glutena Pronazom. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=2). Srednje vrednosti uzoraka sa različitim slovima u istoj seriji merenja su statistički značajno različite (p < 0,05).	88
Slika 9.8.1. Prikaz odzivne površine stepena hidrolize hidrolizata proteina brašna: uticaj pH reakcije i E/S.	93
Slika 9.8.2. Prikaz odzivne površine stepena hidrolize hidrolizata proteina brašna: uticaj E/S odnosa i sadržaja supstrata (S).	94
Slika 9.8.3. Prikaz odzivne površine alergenosti hidrolizata proteina brašna: uticaj pH reakcije (A) i E/S odnosa (C).	94
Slika 9.8.4. Prikaz odzivne površine stepena a) inhibicije ABTS radikala i b) heliranja jona metala, hidrolizata proteina brašna: uticaj temperature reakcije hidrolize i E/S odnosa.	97
Slika 9.8.5. Prikaz odzivne površine stepena a) inhibicije ABTS radikala i b) heliranja jona metala, hidrolizata proteina brašna: uticaj pH reakcije hidrolize i E/S odnosa.	98
Slika 9.8.6. Prikaz odzivne površine stepena a) inhibicije ABTS radikala i b) heliranja jona metala, hidrolizata proteina brašna: uticaj sadržaja supstrata (S) i E/S odnosa.	99
Slika 9.8.7. Prikaz odzivne površine stepena a) inhibicije ABTS radikala i b) heliranja jona metala, hidrolizata proteina brašna: uticaj T i pH reakcije.	100
Slika 9.8.8. Prikaz odzivne površine stepena heliranja jona metala, hidrolizata proteina brašna: uticaj pH reakcije hidrolize i sadržaja supstrata (S).	101
Slika 9.9.1. Mixolab® krive ispitanog heljdnog integralnog brašna, heljdnog integralnog brašna supstituisanog sa 1% HB 15% (w/w) i heljdnog integralnog brašna supstituisanog sa 5% HB 15% (w/w). Ciljana vrednost konzistencije zamese postavljena je na C1=1,1 ± 0,0 Nm.....	103

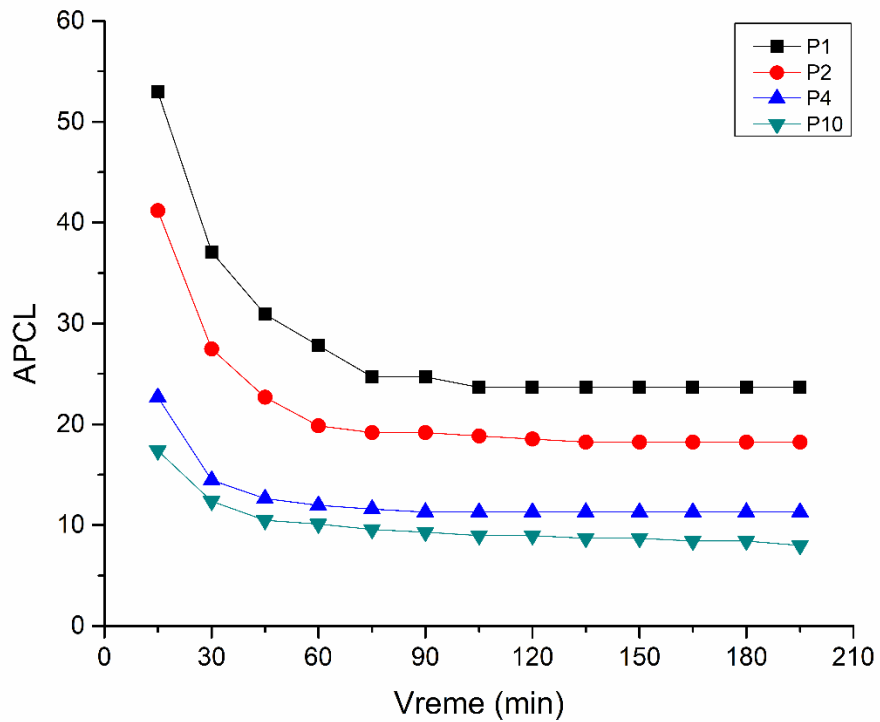
13. Spisak tabela

Tabela 2.1. Pregled različitih mikrobnih izvora enzima sa sposobnošću da smanje alergnost glutena.....	6
Tabela 3.1. Proizvodnja žitarica (u tonama) u svetu i Srbiji (FAO, FAOSTAT Database 2022, 2022).....	8
Tabela 3.2. Ponavljajući segmenti u različitim frakcijama peptida glutena i njihove molekulske mase.....	10
Tabela 4.1. Osnovne karakteristike pšenično-zavisnih poremećaja [izvor i prilagođeno (Scherf, Koehler, & Wieser, 2016)].....	14
Tabela 4.2. Imunogeni peptidi gliadina (izvor i prilagođeno (Ciccocioppo, Di Sabatino, & Corazza, 2005)).....	14
Tabela 4.3. Komercijalno dostupni ELISA testovi za detekciju glutena.....	17
Tabela 6.1. Kodirani nivoi faktora za Box-Behnken dizajn (Box & Behnken, 1960).....	22
Tabela 8.1. Formulacija selektivnih podloga (SP) (Stressler, et al., 2015).....	28
Tabela 8.2. Formulacija LB medijuma.....	28
Tabela 8.3. Formulacija Gluten-fermentacionog medijuma (Stressler, et al., 2015).....	28
Tabela 8.4. Priprema razblaženja goveđeg serum albumina za određivanje standardne prave za određivanje koncentracije proteina.....	30
Tabela 8.5 Receptura za pravljenje pufera za uzorke proteina.....	39
Tabela 8.6. Receptura za pravljenje pufera za elektroforezu.....	40
Tabela 8.7. Receptura za pravljenje rastvora za bojenje i obezbojavanje.....	40
Tabela 8.8. Eksperimentalna postavka Box-Behnken modela za 3 nivoa i 4 faktora, sa ukupno 29 eksperimentalnih tačaka.....	43
Tabela 8.9. Parametri modifikovanog Chopin+ protokola.....	43
Tabela 9.1 Aktivnost proteaza (U/ml) i specifična aktivnost proteaza (U/mg) u sirovom enzimskom preparatu nakon 48 h inkubacije na 37 °C pri različitom sadržaju glutena (0–10 g/l).....	45
Tabela 9.2. Aktivnost proteaza (U/ml) i specifična aktivnost (U/mg) sirovog enzimskog ekstrakta nakon 48 h inkubacije na 37 °C pri različitom sadržaju peptona (0–1 g/l).....	45
Tabela 9.3. Sadržaj (%) sekundarne strukture u mikrotalasno tretiranim uzorcima i u hidrolizazima mikrotalasno tretiranih uzoraka (Alkalaza, pH 8,0, T 60°C).....	63
Tabela 9.4. Srednje vrednosti veličine i polidisperzni indeks (netretirani i mikrotalasno pretretirani, Alkalaza, pH 8,0, T 60°C). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3).....	65
Tabela 9.5. Sadržaj sekundarne strukture (%) proteina sirovog brašna i hidrolizata proteina brašna (Alkalaza, pH 8,0, T 60°C).....	67
Tabela 9.6. Srednji prečnik čestica (d, nm) i koeficijenti raspodele (PDI) hidrolizata proteina brašna (Alkalaza, pH 8,0, T 60°C). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3).....	71
Tabela 9.7. Sadržaj sekundarne strukture (%) hidrolizata glutena Pronazom.....	73
Tabela 9.8. Srednje Z-vrednosti veličine i koeficijenti raspodele hidrolizata glutena Pronazom. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3).....	75
Tabela 9.9. Indeksi emulgujuće aktivnosti (EAI) i emulzione stabilnosti (ESI), kapacitet (FC) i stabilnost (FS) pene za netretirani gluten, kontrolni i mikrotalasni hidrolizat.....	77
Tabela 9.10. Antioksidativne aktivnosti ABTS (%), MICA (%) i DPPH (%) sirovog glutena, hidrolizovanog glutena i mikrotalasno pretretiranog i hidrolizovanog glutena.....	78
Tabela 9.11. IC ₅₀ (mg/ml) vrednosti antioksidativne aktivnosti ABTS (%), MICA (%) i DPPH (%) sirovog glutena, hidrolizovanog glutena i mikrotalasno pretretiranog i hidrolizovanog glutena.....	80
Tabela 9.12. Indeksi emulgujuće aktivnosti (EAI) i emulzione stabilnosti (ESI), kapacitet (FC) i stabilnost (FS) pene sirovog brašna i hidrolizata proteina brašna (Alkalaza, pH 8,0, T 60°C).....	83

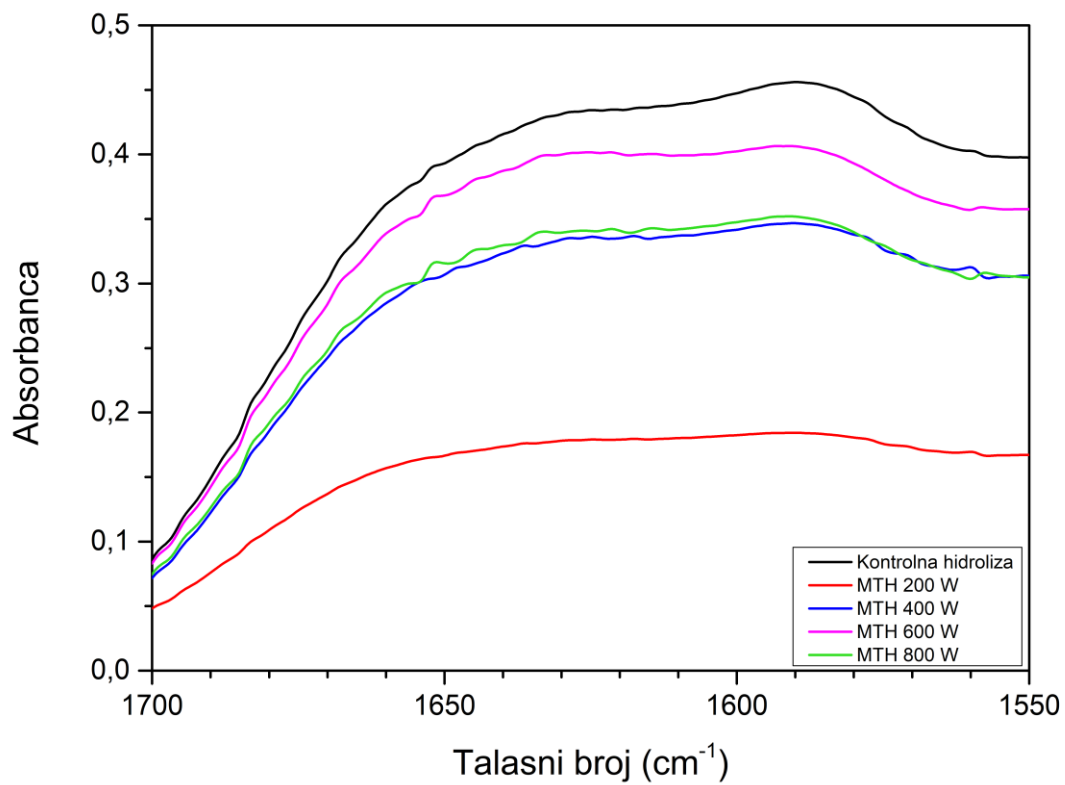
Tabela 9.13. IC ₅₀ (mg/ml) vrednosti antioksidativne aktivnosti ABTS (%), MICA (%) i DPPH (%) sirovog brašna i hidrolizata proteina brašna (Alkalaza, pH 8,0, T 60°C).....	85
Tabela 9.14. Antioksidativne aktivnosti ABTS (%), MICA (%) i DPPH (%) sirovog glutena i hidrolizata glutena Pronazom.	89
Tabela 9.15. IC ₅₀ (mg/ml) vrednosti antioksidativne aktivnosti ABTS (%), MICA (%) i DPPH (%) sirovog glutena i hidrolizata glutena Pronazom.	89
Tabela 9.16. Antimikrobne aktivnosti hidrolizata glutena.....	90
Tabela 9.17. Odzivne funkcije odabranih svojstava hidrolizata proteina brašna, izražene preko kodiranih vrednost odabranih faktora.	91
Tabela 9.18. Eksperimentalna postavka Box-Behnken modela sa 3 nivoa i 4 odziva.....	92
Tabela 9.19. Rezultati dobijeni statističkom obradom podataka pomoću ANOVA metode.	92
Tabela 9.20. Rezultati Miksolab analize heljadinog integralnog brašna i heljadinog integralnog brašna supstituisanog sa hidrolizatom proteina brašna HB 15% (w/w) (Modifikovani Chopin + protokol).....	102

Prilozi

Prilozi

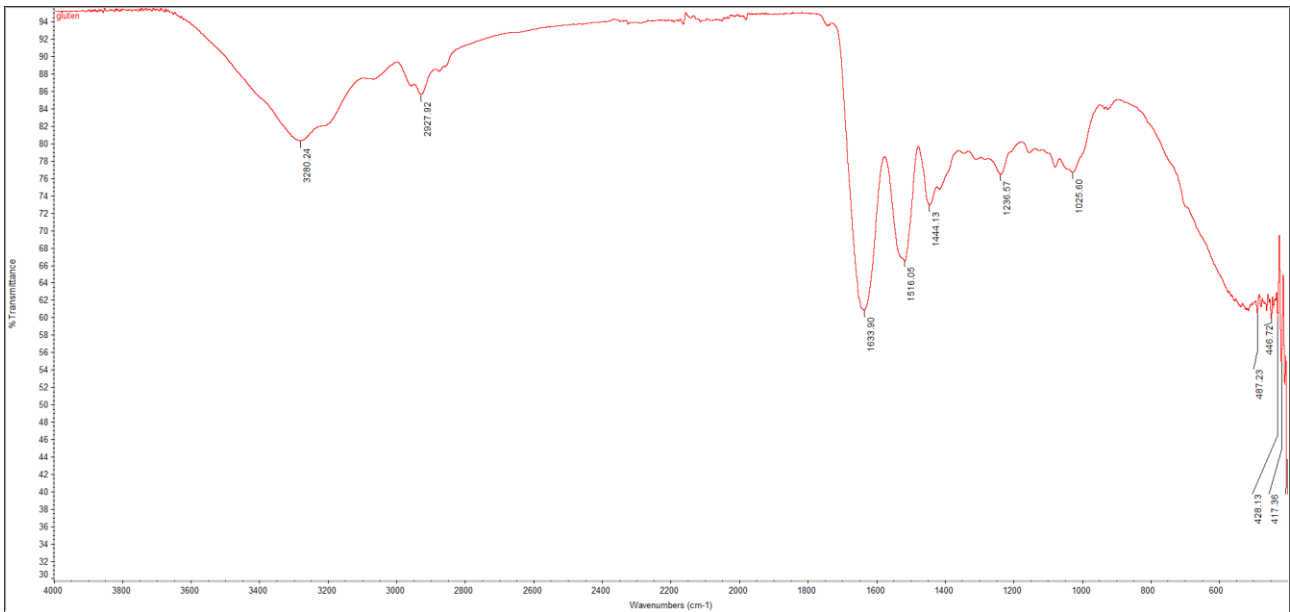


Slika P 1. Promena dužine peptidnih lanaca tokom hidrolize glutena Pronazom (pH 8, 50 °C).

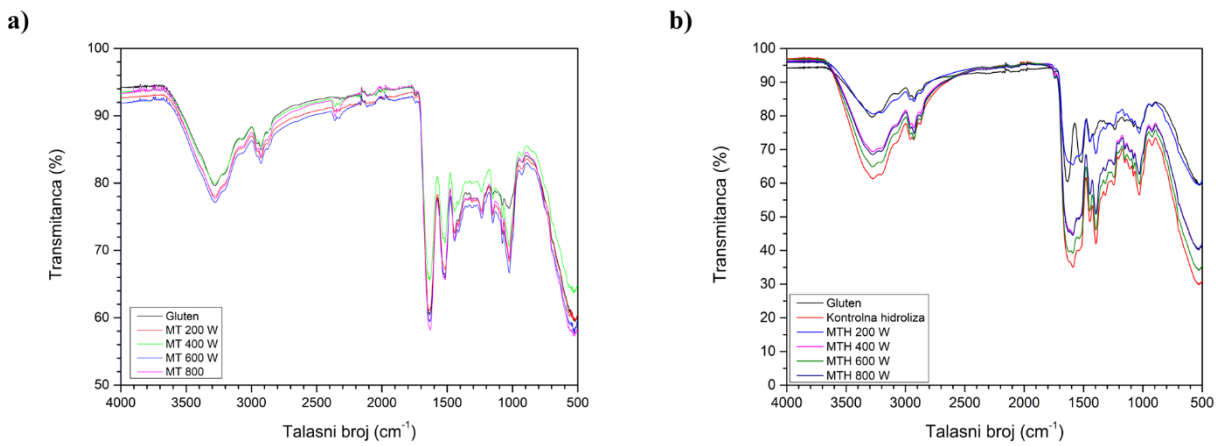


Slika P 2. Amid I regija kontrolnog hidrolizata i mikrotalasno pretretiranih hidrolizata glutena.

Prilozi



Slika P 3. FTIR spektar sirovog glutena.



Slika P 4. FTIR spektri a) netretiranog glutena i mikrotalasno tretiranog glutena, b) netretiranog glutena, kontrolnog hidrolizata glutena i mikrotalasno pretretiranih hidrolizata glutena (Alkalaza, pH 8, 60 °C).

Prilozi

Dokaz o plaćenju naknadi za korišćenje usluge BioRender

Invoice

bioRender

Invoice number 27D429BC-0001
Date of issue July 31, 2023
Date due July 31, 2023

Science Suite Inc. DBA BioRender
49 Spadina Avenue
Suite 200
Toronto Ontario M5V 2J1
Canada
+1 844-970-3616
support@biorender.com

Bill to
Ivana Gazikalović
[REDACTED]
Belgrade
11070
Serbia
igazikalovic@tmf.bg.ac.rs

Ship to
Ivana Gazikalović
[REDACTED]
Belgrade
11070
Serbia

\$39.00 USD due July 31, 2023

[Pay online](#)

Description	Qty	Unit price	Amount
Academic Individual Plan Monthly (Charged in USD) (per seat) Jul 31 – Aug 31, 2023	1	\$39.00	\$39.00
Subtotal			\$39.00
Total			\$39.00
Amount due			\$39.00 USD

Wire Payment (ACH) Information:

Please send wire payments to: SCIENCE SUITE INC.

ABA/Routing Number: 026013958

Beneficiary Account Number: 665857182

Wire Payment Information:

Swift Code: CINAUS6L (International)

Bank Name: City National Bank, Bank Address: 1140 Avenue of the Americas, New York, NY 10036

Prilozi

Biografija autora

Ivana V. Gazikalović rođena je 21.06.1992. godine u Beogradu, Republika Srbija, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Osnovne studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, studijski program Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija upisala je školske 2011/12 godine, a diplomirala je 2015.godine. Master studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, studijski program Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija upisala je školske 2015/16 godine i završila 2016. godine. Doktorske studije je upisala Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, studijski program Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija školske 2016/17 godine pod mentorstvom prof. dr. Zorice Knežević-Jugović. Bila je stipendista-doktorand Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja u okviru projekta III 46010 od aprila 2017.godine. U junu 2018.godine je prema javnom pozivu za uključivanje mladih istraživača na projekte Ministarstva stekla zvanje istraživač pripravnik i zaposlena u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta. Učesnik je projekata III 46010, Eureka E!13082 BIOFLOSBAKE – LAVGLU, COST – PHOENIX, AmnioPrintCare PROMIS 2023, nekoliko inovacionih vaučera i sajмова.

Ivana V. Gazikalović je, kao autor i koautor do sada učestvovala u izradi 1 rada u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), 3 rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M22) i 1 rada u međunarodnom časopisu (M23), više konferencijskih radova (M30, M60 kategorije), 1 tehničkog rešenja i 1 prijave domaćeg patenta.

Prilozi

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Ivana V. Gazikalović
Broj indeksa 4016/2016

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Enzimaska modifikacija pšeničnog glutena u cilju smanjenja njegove alergenosti i
poboljšanja funkcionalnih svojstava

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,
07.03.2024.

Potpis autora

Ivana Gazikalović

Prilozi

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Ivana V. Gazikalović

Broj indeksa 4016/2016

Studijski program Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

Naslov rada Enzimaska modifikacija pšeničnog glutena u cilju smanjenja njegove alergene i poboljšanja funkcionalnih svojstava

Mentor Prof. dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,
07.03.2024.

Potpis autora

Ivana Gazikalović

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Enzimaska modifikacija pšeničnog glutena u cilju smanjenja njegove alergnosti i poboljšanja funkcionalnih svojstava

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
- 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

U Beogradu,
07.03.2024.

Potpis autora

Nađa Gazikalović

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.

Prilozi

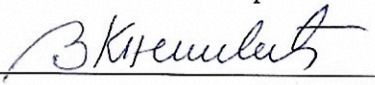
ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Ензимска модификација пшеничног глутена у циљу смањења његове алергености и побољшања функционалних својстава”, аутора Иване Газикаловић, констатујем да утврђено подударане текста износи 10%. Овај степен подударности последица је употребе општих места, стручних термина, назива метода, хемикалија и њихових скраћеница, описа стандардних експерименталних процедура и метода, објашњења појмова и одређених бројчаних вредности које се налазе у тези, личних имена, библиографског формата цитиране литературе у тексту дисертације (презиме и име аутора, година), публикованих резултата докторандових истраживања који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

28.03.2024. године

Ментор


Зорица Кнежевић-Југовић