

Употреба протеина биљака у производњи хране за људе

Јована Глушац, Биљана Кукавица, Ауелет Фишман

Сажетак Све већа склоност вегетаријанској и веганској ихрани довела је до развоја нових и разноврсних прехранбених формула базираних на протеинима биљног поријекла високе нутритивне вриједности. Индустијски споредни производи, као што су функционални протеини кромпира и нефункционалне фракције кукуруза-зеин, заједно са протеинима грашка су обећавајући извори протеина у прехранбеним производима. Главни циљ недавних истраживања био је побољшавање функционалности зеина, те употреба нуспроизвода индустрије скроба-протеина кромпира, као и протеина грашка. Ови протеини су ензимски посредованим ковалентним умрежавањем модификовани и њихова примјена у производњи прехранбених производа се истражује. По први пут се показује функционализација зеина у концентрованим емулзијама уље-у-води. Емулзије, које садрже 40% уља, произведене су помоћу ензимског умрежавања протеина кромпира или протеина грашка раствореног у воденој фази и зеина диспергованог у уљаној фази.

Глушац Ј, Кукавица Б, Фишман А (2020) Употреба протеина биљака у производњи хране за људе. У: Перспективе развоја прехранбене индустрије (Грујић Р, Јањић В, Тркуља Р, уредници). Академија наука у умјетности Републике Српске, Бања Лука: 449 - 474.

Glušac J, Kukavica B, Fišman A (2020) The use of plant proteins in the production of food for humans. In: Food industry development prospects (Grujić R, Janjić V, Trkulja R, Eds). The Academy of Sciences and Arts of Republic of Srpska, Banja Luka: 449 - 474.

Показано је да бактеријска тирозиназа изолована из *Bacillus megaterium* игра кључну улогу у формирању гел-структуре, структуре зеин-протеини кромпира, или зеин-протеини грашка стабилованих концентрованих уља у води емулзија. Тирозиназама умрежене емулзије су биле стабилне током мјесец дана без примјетног одвајања фаза, у упоредби са неумреженим емулзијама. Повећање стабилности приписује се формирању ковалентних веза између протеина кромпира или грашка и зеина. Фракције зеина и протеина кромпира/грашка се међусобно надопуњују у аминокиселинском саставу и на тај начин пружају потпуну нутритивну вриједност потрошачима. Комбиновањем других ензима, као што је трансглутаминаза, у емулзијском систему може отворити могућност коришћења различитих ензима, као и различитих извора протеина (супстрата) заједно са зеином за продужење стабилности и побољшања текстуралних својства финалног прехранбеног производа. Формирање ензимских ковалентних веза у комплексима протеина зеин-грашак или зеин-протеини кромпира могу бити један од примјера у дизајнирању и различитих веганских или вегетеријанских производа на бази емулзија.

Кључне ријечи: Протеини биљног поријекла, Протеини из кромпира, Протеини из грашка, Зеин-протеини

14.1. Увод

Један од изазова везаних за раст популације у свијету је изузетно висока потрошња хране, посебно протеина животињског поријекла. Према FAO процјенама предвиђа се удвостручење потражње за протеинима до 2050. године (FAO 2011). Стога постоји велика потреба за повећањем понуде из нових и одрживих извора протеина, уз побољшавање њихове функционалности. Биљни протеини постају једна од важних истраживачких тема и имају потенцијал да допуне или замијене животињске протеине у храни.

У посљедњих неколико година јављају се два уочљива тренда која су у интересу потрошача хране. Први тренд је повећање здравствене свијести у смјеру смањења садржаја шећера, масти и неприродних састојка хране (*clean label*, Eng). Други тренд се огледа у растућој потражњи алтернативних извора хране и протеина који нису животињског поријекла, због идеолошких увјерења, или еколошке свјесности. Око 10% свјетске популације су вегани и вегетаријанци, који су онедавно рангирани као први и трећи тренд у ихрани (Bohrer 2017). Стога, постоји све већа потражња за развојем нових и разноврсних немесних прехранбених формулација са високом нутритивном вриједношћу и пожељним сензорским својствима. Протеини биљног поријекла, добијени из отпада, препознати су као обећавајуће сировине за одрживу производњу нових прехранбених производа богатих протеинима (Hicks and Verbeek 2016).

Умрежавање протеина (*crosslinking*, Eng), дефинисано као "процес спајања" молекула протеина преко интер- или интра-молекуларних ковалентних веза, игра главну улогу у одређивању функционалних својстава хране и нуди сигурно и

одрживо рјешење за коришћење нових извора протеина. Умрежавањем се стварају нова макромолекуларна једињења, која често имају физичко-хемијска и функционална својства различита од исходних једињења. Модификовањем броја, као и природе ковалентних веза приликом обраде хране, произвођачима хране се омогућава да утичу и на функционална својства протеина у финалним производима.

14.2. Протеини биљног поријекла

Високо квалитетни, нутритивно вриједни и јефтини, нови извори протеина су у великој мјери циљ многих истраживања. Биљни протеини пречишћени и изоловани из нуспроизвода у индустријским процесима, који се обично користе као извор хране за животиње, представљају нове сировине за одрживу производњу прехранбених производа. Када снабдијевање животињским протеинима достигне свој максимални капацитет, очекује се повећана потражња за протеинима биљног поријекла (Aiking 2011).

У овом поглављу ће бити представљена три биљна протеина: протеини кромпира, протеини кукуруза-зеини и протеини грашка.

Протеини кромпира постају све присутнији у прехранбеним производима, због високог нутритивног квалитета упоредивог са протеинима цијелог јајета (Liedl et al. 1987; Friedman 1996). Они посједују висок индекс есенцијалних аминокиселина (Pouvreau et al. 2001; Alting et al. 2011) и сматрају се ГРАС (*General Recognized as Safe*, Eng) састојцима хране. Они су неалергени и могу се инкорпорирати у вегетаријанске, веганске и Кошер Парве производе (David and Livney 2016). У погледу здравствене вриједности, доказано је да протеини кромпира посједују способност регулисања нивоа серумског холестерола (Liyange et al. 2008) и да дјелују као потенцијални хемијски антиканцерогени агенс (Sun et al. 2013). Хидролизоване протеини кромпира имају изузетне антиоксидативне особине (Nieto et al. 2009; Cheng et al. 2010; Udenigwe et al. 2016).

Зеини, класификовани као проламини, су главни протеини у кукурузу и чине 60% укупних протеина (Shukla and Cheruan 2001). Зеин је углавном богат глутаминском киселином (21-26%), леуцином (20%), пролином (10%) и аланином (10%), али му од есенцијалних аминокиселина недостају лизин и триптофан (Dhillon et al. 2016). Због свог аминокиселинског састава, висок проценат хидрофобних остатака, фракције зеина имају лошу растворљивост у води и углавном су растворљиви у воденим алкохолним растворима, при високим концентрацијама урее, алкалним растворима (pH 11 или вишим), или са анјонским детерџентима (Parman and Lamsal 2011). Хидрофобна природа зеина ограничава његову примјену у различитим биотехнолошким процесима и прехранбеним производима. Али, с друге стране, његова способност да физички "ухвати" велики број хидрофобних једињења, чини зеин атрактивним системом за транспорт различитих функционалних компоненти (кверцетин, куркумин, β -каротен, полифенолна

једињења биљног поријекла, есенцијална уља, витамини, минерали и др) (Patel et al. 2010; 2012; Patel and Velikov 2014). Најважнии правци примјене зеина су израда полимерних материјала за филмове и премазе у производњи пластичних материјала (Lawton 2002). Комбинација зеина са другим полимерима, као што је пектин, довела је до стварања хидрогела са повећаном ефикасношћу енкапсулације и стабилнијом мрежом пектина.

Протеини грашка имају важну улогу у многим прехранбеним производима, због њихове храњиве вриједности и њиховог утицаја на текстуру хране (Sun and Arntfield 2011). Због повећаног интересовања потрошача за биљне протеине и релативно ниских трошкова производње грашка, продаја протеина грашака се брзо повећава и очекује се да ће до 2020. године њена вриједност достићи 34,8 милиона долара. Протеини грашка се сматрају добрим извором есенцијалних аминокиселина са високим садржајем лизина, али са ниским садржајем метионина (Boye et al. 2010). Комерцијално доступни концентрати или изолати протеина грашака могу имати лоше функционалне особине, због различитих процеса фракционирања.

14.2.1. Протеини кромпира

Кромпир се налази на четвртм мјесто производње, послје кукуруза, пиринча и пшенице (FAO 2011). Годишња производња кромпира је 322 милиона тона, док производња кукуруза, пиринча и пшенице износи 785, 652 и 607 милиона тона, респективно. Кромпир је као такав дио дневног менија великог броја потрошача. Међутим, кромпир се такође широко користи као сировина за екстракцију скроба. Свјежи кромпир, садржи око 80% воде и 20% суве материје, у којој око 60 до 80% представља скроб. У прехранбеној индустрији се користи природни скроб или модификовани скроби. Годишње се произведе више од 2 милиона тона кромпиновог скроба, који се углавном прерађује у ЕУ.

Протеин кромпира је још један од састојака кромпира који је недавно привукао пажњу. Садржај протеина кромпира у сувој маси је сличан као код житарица. Због високог приноса и узгоја, кромпир је корисна сировина за екстракцију протеинских састојака.

Иако протеини кромпира дужи низ година представљају нуспроизвод приликом екстракције скроба, недавни развој догађаја у технологијама екстракције резултирали су израдом препарата протеина кромпира са изузетно вриједним техно-функционалним и нутритивним својствима. Протеини кромпира високог квалитета могу се комерцијално изоловати у индустрији скроба као нуспроизвод.

Просјечни садржај протеина кромпира је око 1,2%, док се у индустријској производњи скроба добије око 240.000 тона високо квалитетног протеина кромпира годишње.

Међу различитим изворима неживотињских протеина, биљни протеини су широко примијењени као састојци хране, због својих функционалних својстава и доступности (Aiking 2011). Протеини кромпира постају све чешћи састојци у прехранбеним производима, због високог нутритивног квалитета који се може упоредити с протеином цијелог јајета или протеинима млијека (Friedman 1996; Liedl et al. 1987). Због високог индекса есенцијалних аминокиселина (Alting et al. 2011; Pouvreau et al. 2001), те ГРАС статуса праћеним одсуством алергена налазе широку примјену у вегетаријанским, веганским и кошер парве производима (David and Livney 2016).

Протеини кромпира добијају се из отпада кромпира, познатог као воћни сок од кромпира, који је индустријски нуспродукт у скробној индустрији. Количина отпада (и могућих нуспроизвода) насталих у производним процесима износи до 80% за кромпир (Hicks and Verbeek 2016).

Преципитација амонијум сулфатом је јефтина и брза метода за изоловање протеина кромпира са релативно високим степеном растворљивости и мањим степеном пречишћености. Према неким резултатима фракција богата протеинима кромпира, добијена преципитацијом амонијум сулфата, садржавала је 62,6% протеина. Према претходним студијама, очекивани садржај липида, сахараида и пепела је у распону од 3-13,6%, 0,6-6% и 1,2-6%, редом (Løkra et al. 2008; Vikelouda and Kiosseoglou 2004).

Различити поступци преципитације, као што су примјена топлоте, киселине, етанола, фери хлорида и амонијев сулфата, претходно су проучавани за изолацију протеина кромпира (Knorr et al. 1977; van Koningsveld et al. 2001; Bartova and Barta 2009). Висок принос протеина и добра растворљивост, с ниским фактором пречишћености, добијени су када је као средство за изоловање протеина кромпира кориштена преципитација са амонијум сулфатом. Познато је да протеини кромпира посједују ниску растворљивост која може бити главно ограничење у њиховом пречишћавању и у даљој примјени (Van Koningsveld et al. 2001; 2006; Cheng et al. 2010; Santos et al. 2015). Приликом екстракције са водоводном водом, фактор пречишћености је обично низак, око 46% протеина, док је такође ниска растворљивост (Ralet and Gueguen 2000). Знатно већа концентрација протеина је добијена ултрафилтрацијом (61%) (Baier and Knorr 2015). До данас најбоља и најефикаснија метода за изоловање протеина кромпира је хроматографија протеинских експандираних слојева, која резултује са концентратима протеина кромпира у распону од најчешће 83,8-88,1%. Хроматографија експандираних слојева протеина је ефикасан процес изолације протеина кромпира са степеном пречишћености у распону од 72-96% (Løkra et al. 2008; 2009). Међутим, ова метода се користи у индустријским размјерима и изузетно је скупа.

Због високе нутритивне вриједности, протеини кромпира се користе као додатак различитим прехранбеним производима, између осталих приликом производње сира (Spelbrink et al. 2015), производње безглутенског хљеба (Witczak et al. 2017), у производњи црног и бијелог вина (Gambuti et al. 2012; 2016), кобасица и других

производа од меса (Grujić i sar. 2014). Осим тога, високо развијене способности емулговања (Ralet and Gueguen 2000; Romero et al. 2011; van Koningsveld et al. 2006), пјењења (Baier and Knorr 2015; van Koningsveld et al. 2002) и желирања (Creusot et al. 2011) омогућиле су протеинима кромпира да се нађу у категорији нових високо вриједних и функционалних протеина.

У смислу здравствених предности, доказано је да пататин (једна од фракција протеина кромпира) посједује способност регулисања нивоа холестерола у серуму (Liyanage et al. 2008), те да дјелује као потенцијални хемопревентивни агенс за рак (Sun et al. 2013). Хидролизоване протеине кромпира показали су изузетна антиоксидативна својства (Cheng et al. 2010; Nieto et al. 2009; Udenigwe et al. 2016).

Протеини кромпира имају три главне класе: пататин (до 40%), инхибиторе протеазе (до 50%) и друге (углавном протеине високе молекулске масе) (Pouvreau et al. 2001; Løkra et al. 2008). Пататин, глобуларни гликопротеин са изоелектричном тачком између 4.5 и 5.2, је димер који се појављује као мономер (40-45 kDa) у присуству натријум додецил сулфата. Инхибитори протеазе су најзаступљенија и хетерогена група протеина са молекуларним масама од 5-25 kDa (Pots et al. 1999). Најчешћи чланови су инхибитори серин протеазе (ПИ-1 и ПИ-2 из породице Кунитз), инхибитори цистеин протеазе кромпира (ПЦПИ), инхибитори аспартатне протеазе кромпира (ПАПИ), други инхибитори протеаза Кунитз (ПКПИ) и инхибитори карбоксипептидазе кромпира (Pouvreau et al. 2001). ПИ-2 је димерни протеин са једним дисулфидним мостом и молекулском масом од 22 kDa, док је ПИ-1 пентамерни протеин састављен од пет 7-8 kDa изоинхибитора (Pouvreau et al. 2001). ПЦПИ се сматра бета-II протеином заснованим на структурним особинама које су сличне оним својствима инхибитора серинске протеазе кромпира и инхибитора сојиног трипсина типа Кунитз (Pouvreau et al. 2005). Инхибитори протеазе кромпира варирају у својим инхибиторским ефектима међу групама, али генерално инхибирају трипсин, химотрипсин и еластазу хуманог леукоцита (Pouvreau et al. 2001). Они имају антикарценогено дејство (Kennedy 1998) и позитивни дијететски ефекат путем дјеловања на ослобађање холецистохенина (Komarnutsky et al. 2011).

Показало се да протеини кромпира, као сирови екстракт, имају лоше емулгујуће особине (Ralet and Gueguen 2000), тако да су различите методе кориштене за побољшање његове способности емулговања, као и стабилности емулзија, као што су: хидролизација (Nieto et al. 2009), рН третман или модулација јонске снаге (Delahaije et al. 2013), сукцинилација (Delahaije et al. 2014), фосфорилација (Miedzianka and Peksa 2013), додавање хитозана (Calero et al. 2013), додаток к-карагенана, додавање гуар гуме (Santos et al. 2015) и коњугација са галактозом, галактоолигосахаридима или галактаном (Seo et al. 2014). Осим тога, нађено је да фракционисани изолат протеина кромпира има боље емулгирајуће особине од сирове смјесе протеина кромпира (Ralet and Gueguen 2000).

Модификовање својстава протеина ензимским умрежавањем, увођењем нових ковалентних веза, може проширити њихову примјену. Ензиматски приступ осигурава сигурну биолошку технику за побољшање својстава хране (Zorn and Li

2017). Показано је да умрежавање протеина тирозиназама различитог поријекла повећава чврстоћу гела у производима од меса (Lannto et al. 2007) и побољшава физичку стабилност емулзија протеина млијека (Selinheimo et al. 2007).

14.2.2. Протеини кукуруза-зеини

Кукуруз је један од усјева који се највише производе у свијету, са годишњом производњом од око 900 милиона метричких тона (FAO 2011). Кукуруз има четири методе обраде, укључујући мокро мљевање, мљевање на суво, обраду сувог мљевења и алкалну обраду. Кукурузно глутенско брашно је копродукт процеса кукурузног мљевења у производњи кукурузног скроба, влакана и уља. Глутенско брашно је нуспроизвод богат протеинима из којег се зеин може екстраховати са високим приносом, у упоредби с другим методама обраде кукуруза. Познато је да више од 40% отпада у виду глутенског брашна настаје у производим процесима (Hicks and Verbeek 2016).

Зеин је подијељен, на основу растворљивости, молекулске масе и структуре у четири различите фракције: α , β , γ и δ (Ni and Dumont 2017). Главни зеин-протеин је α -зеин (80-85%) који се састоји од два протеина са молекулском масом од 22 и 24 kDa, што је и најобимнија фракција у пречишћеном зеину из кукурузног глутенског брашна. β -зеин (~ 10%) се састоји од једне субјединице са молекулском масом од 17 kDa, γ -зеин (10-15%) састоји се од двије субјединице $\gamma 1$ (27 kDa) и $\gamma 2$ (18 kDa). У нативном зеину, β и γ зеин су повезани дисулфидним везама и мање су хидрофобни од α -зеина (Paraman and Lamsal 2011). δ -зеин се састоји од једне субјединице молекулске масе од 10 kDa (Huang et al. 2004).

Зеин је најчешће примијењен као полимерни материјал за израду филма, премаза и пластике (Lawton 2002). Зеин је углавном богат глутаминском киселином (21–26%), леуцином (20%), пролином (10%) и аланином (10%), али недостају есенцијалне аминокиселине лизин и триптофан (Dhillon et al. 2016), стога је мање префериран у људским прехранбеним производима (Luo and Wang 2016). Међутим због GRAS статуса и због неалергености користи се и у прехранбеној индустрији. Његова хидрофобна природа доприноси слабој растворивости у води и ограничава примјену зеина у прехранбеним производима. Зеин је коришћен за стабилизацију емулзионог гела уље-у-глицеролу као здравом замјеном за маргарин у припреми колача (Chen et al. 2016), као аналог мастима у формулацији мајонезе (Gu et al. 2016), стабилизацији пјене и емулзија (Blanco et al. 2016), те у производњи безглутенског хљеба или тијеста (Jeong et al. 2017; Smith et al. 2017). Међутим, због недостатка неколико есенцијалних аминокиселине, његова комбинација са другим комплементарним протеинима, као што су протеини кромпира или грашка, могу довести до уравнотеженог прехранбеног производа.

14.2.3. Протеини грашка

Протеини легуминоза играју важну улогу у многим прехранбеним производима, због нутритивне вриједности и утицаја на текстуру хране (Sun and Arntfield 2011). Тржиште протеина грашка убрзано расте и очекује се да ће до 2020. године доћи до 34,8 милиона долара, због раста интереса потрошача за састојке биљних протеина и релативно ниске трошкове производње грашка. Протеини грашка се сматрају као добар извор есенцијалних аминокиселина са високом количином лизина, али ниским количинама метионина (Boye et al. 2010). Комерцијално доступни концентрати, или изолати протеина грашка, могу имати лоша функционална својства, због различитих процеса фракционисања. Недавне студије су показале да протеини грашка имају добар потенцијал за стабилизацију емулзија уље у води (Chen et al. 2016).

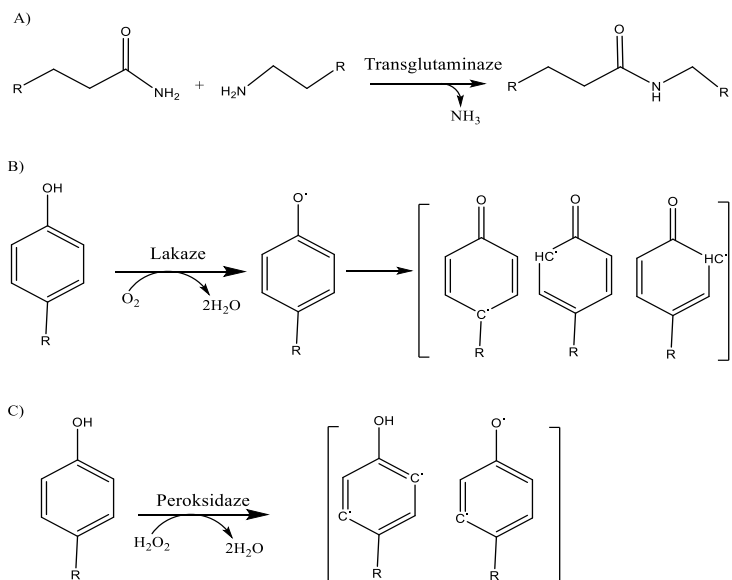
Сјеме грашка садржи између 20-30% тежине укупних протеина састављених од 7S/11S глобулина (50-60% укупног) и албумин 2S (15-25%) (Barac et al. 2010). Хексамерни хомо-олигомер, легумин (11S) и тримери вицилин/конвицилин (7S) су главне глобуларне протеинске фракције. Легумин (~360-400 kDa) има сваку субјединицу (~60 kDa) састављену од киселих (38-40 kDa) и базиних полипептида (19-22 kDa) повезаних једном дисулфидном везом (Barac et al. 2010). Субјединица легумина има приближно четири метионинска остатка и између 2-7 цистеинских аминокиселинских остатака. Вицилин 7S је тримерни протеин са молекулском масом ~ 150 kDa, којем недостају аминокиселине са сумпором и стога не може формирати дисулфидне везе. Вицилинске субјединице могу варирати тако да су нађене фракције са различитим молекулским масама ~ 47 kDa, ~ 50 kDa, ~ 34 kDa и ~ 30 kDa (Barac et al. 2010). Неке од 50-kDa субјединица вицилина због посттранслационе протеолизе убрзо након биосинтезе доводе до настанка скраћених пептида (у распону од 12,5 до 33 kDa), али остају и даље повезани са неоштећеним субјединицама у изворном 150 kDa олигомеру (Barac et al. 2010). Конвицилин (~990 kDa), трећи протеин за складиштење, са молекулском масом од ~71 kDa.

14.3. Умрежавање протеина катализовано ензимима

Умрежавање протеина се дефинише као "процес повезивања молекула протеина путем интер- или интрамолекулске ковалентних веза" (Neck et al. 2013). Док се хемијски реагенси, као што су глутаралдехид или формалдехид, често користе за добијање ковалентних веза између протеинских ланаца, повезивање посредством ензима представља пожељну алтернативу. Велика мотивација за истраживање и употребу ензимског умрежавања проистекла је из бројних важних питања. Ензиматски процес је обично сигурнији и има мањи утицај на животну средину у поређењу са хемијским процесом, омогућава употребу благих водених реакционих услова и омогућава смањење трошкова рада. Умрежавање катализовано ензимима често се може контролисати модификовањем

температуре, рН или јонске јачине (Heijns et al. 2010; Heck et al. 2013). Постоје различити ензими који могу генерисати ковалентно умрежавање протеина и стога се користе за различите апликације. Ови ензими се међусобно разликују у смислу реакционог механизма и аминокиселинских остатака са којима реагују (Zeeb et al. 2017).

Трансглутаминаза (Е.С. 2.3.2.13, ТГ) се најчешће користи за умрежавање и једини је комерцијално доступан ензим. Катализује тристепену (триадну) реакцију која укључује и настанак интермедијера између карбоксиамидне групе глутаминских остатака и разних примарних амина, укључујући остатке лизина који воде формирању крајње амидне везе (Слика 14.1А). Специфичност трансглутаминазе за глутаминске и лизинске аминокиселинске остатке ограничава реакцију на протеине који имају глутаминску киселину и лизинске остатке на мјестима доступним активном мјесту ензима. Друга важна група ензима за умрежавање протеина је из породице оксидоредуктаза. Ова група ензима, укључује лаказе (Е.С. 1.10.3.2), пероксидазе и тирозиназе (Слика 14.1Б,Ц).



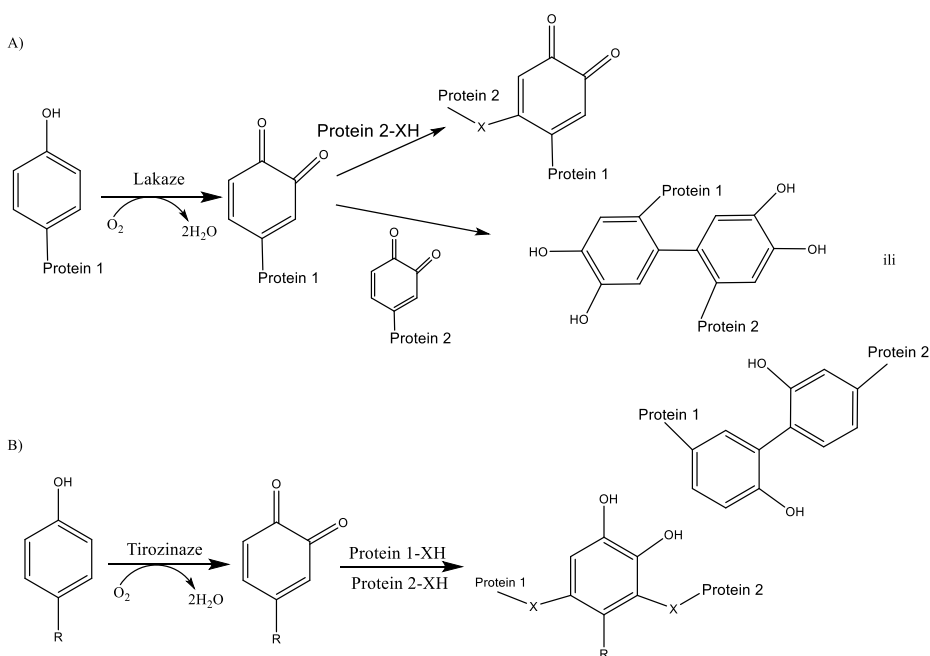
Слика 14.1. Реакције умрежавања катализоване ензимима: (а) Трансглутаминазна, ТГ, (ТГ из микроорганизама) реакција формирања амидне везе, (б) оксидација катализована лактазама, (с) оксидација катализована пероксисазама (Isaschar-Ovdat and Fishman 2018)

Figure 14.1. Reaction scheme of transglutaminase acyltransferase mechanism (a). Tyrosinase monophenolase and diphenolase activity (b). Peroxidase oxidation (c) (Isaschar - Ovdat and Fishman 2018)

Наведени ензими пружају широку специфичност супстрата заједно са различитим циљним остацима и различитим механизмима умрежавања.

У природи, ови ензими се не користе за умрежавање протеина, него иницирају само прву хемијску реакцију, формирају реактивну врсту која се спонтано полимеризује са другим функционалним групама, што доводи до настанка ковалентне везе (Isaschar-Ovdat and Fishman 2018).

Тирозиназе су кориштене за умрежавање углавном у присуству посредника мале молекулске масе као медијатора за умрежавање. На примјер, када је фенол присутан у реакционој смјеси он посредством ензима прелази у реактивни хинон који даље реагује са другим реактивним групама у протеинском ланцу, као што су остаци хидроксила, сулфхидрила или амина. Без додавања фенолног медијатора, умрежавање ће се одвијати преко остатака тирозина (Слика 14.2) и степен умрежавања ће зависити од доступности остатака тирозина активном мјесту ензима.



Слика 14.2. Предложена шема умрежавања протеина катализованих са тирозинима (А) у одсуству фенолног медијатора и (В) у присуству фенолног медијатора (који није приказан на шеми). Х представља хидроксил, амин или сулфхидрил групу. Без фенолног медијатора може доћи и до 1,4 везе и до радикалног спајања, док у присуству фенолног медијатора мале молекулске масе чешће ће доћи до 1,4 везе (Isaschar-Ovdat i Fishman 2017).

Figure 14.2. Proposed reaction scheme of tyrosinase generated crosslinking of proteins (a) in the absence of phenolic mediator and (b) in its presence. X represents a hydroxyl, amine or a sulfhydryl group. Without a phenolic mediator a 1,4 addition or a radical coupling can both occur while in the presence of a small molecular weight phenolic mediator, a 1,4 addition will be more preferred (Isaschar-Ovdat i Fishman 2017).

Тирозиназе различитог поријекла су проучаване у односу на могућности умрежавања глутена, казеина и меса. Гљивичне тирозиназе су у центру истраживања и стога су највише истражене.

Тирозиназе гљивица које су се најчешће користиле у умрежавању протеина су поријеклом из *Agaricus bisporus*, *Trichoderma reesei* и *Botryosphaeria obtuse*. Друге тирозиназе, које су проучаване и коришћене су за процесе умрежавања протеина током протекле деценије, су бактеријске тирозиназе из *Verrucomicrobium spinosum* и тирозиназе из мастила лигње (Vate and Benjakul 2016).

Тирозиназе из *Agaricus bisporus* је највише проучена тирозиназа из гљива и једина комерцијално доступна тирозиназа. Показано је да је користећи ову тирозиназу могуће формирање молекула велике молекулске масе у протеинима β -лактоглобулин и α -лактоалбумин (Thalmann and Lötzbeuer 2002). У студији објављеној 2010. године, Fairhead и Thony-Meyer су показали употребу тирозиназе из *Verrucomicrobium spinosum* за умрежавање различитих протеина, као што су казеин, лизозим, миоглобин и други. Наиме, док је ензим показао добру способност умрежавања протеина са нижим нивоима организације, као што је казеин, протеини са вишим нивоима организације (терцијарном и кватерном) нису били умрежени и захтијевали су додавање молекула мале молекулске масе (фенол или кафеична киселина) као медијатора (Fairhead and Thony-Meyer 2010; 2012).

Друга истраживања су показала позитиван ефекат умрежавања са тирозиназом на формирање филма и површинске особине филмова казеина (Juvonen et al. 2011).

Како је већ речено, протеини са вишим нивоима организације (терцијарном и кватерном) тешко могу бити умрежени без додавање молекула мале молекулске масе, фенолних медијатора. Partanen et al. (2011) су примјеном медијатора са алкалним рН, модификовали доступност β -лактоглобулина за умрежавање помоћу тирозиназа из *Agaricus bisporus* и *Trichoderma reesei*. Студија је показала да до умрежавања β -лактоглобулина са тирозиназом из *Trichoderma reesei* долази на алкалном рН (рН 9), док друга тирозиназа из *Agaricus bisporus* није умрежила протеин нити при неутралном нити при алкалном рН. Алкални рН доводи до промјена у терцијарној структури протеина и доводи до појаве мономера у раствору што је супротно природном димерном облику на неутралном рН. Ове промјене заправо утичу на остатке тирозина који омогућавају ензимску активност (Partanen et al. 2011).

Показано је да је мјешавина тирозиназе и фенола постигла бољи ефекат умрежавања и стабилизацију наночестица натријум-казеината, него када је примјењен глутаралдехид (Xu et al. 2016). Ово се приписује способности хинона да реагује са различитим функционалним групама у протеинима, док би-алдехид може формирати ковалентне везе само између аминских група лизина или остатака хидроксилизина (Xu et al. 2016).

14.4. Умрежавање протеина кромпира, кукуруза (зеина) и грашка помоћу тирозиназе бактеријског поријекла

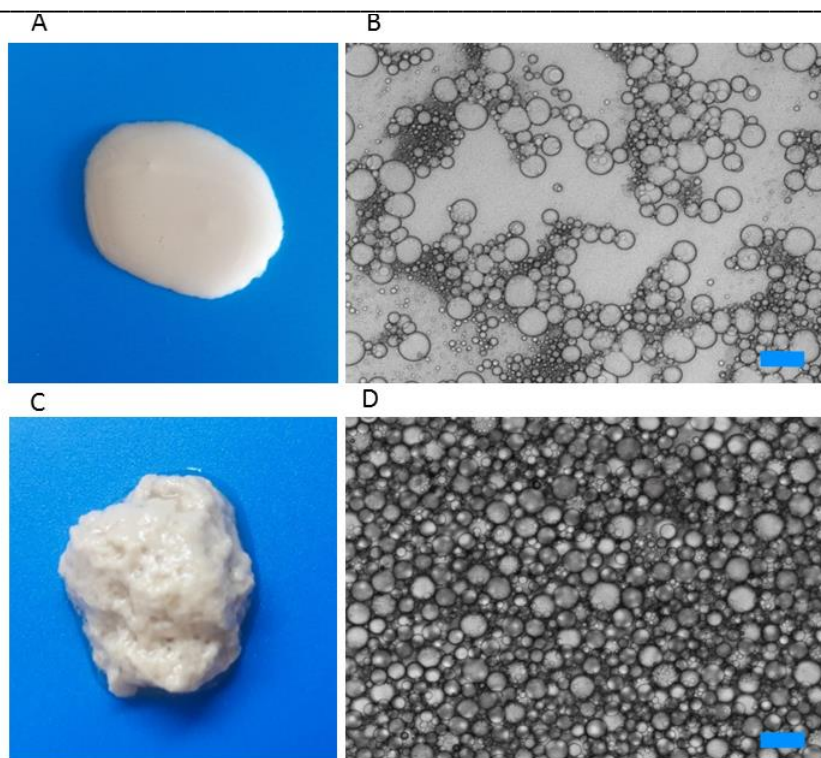
Ензимске технологије које се примјењују на фракције, концентрате или изолате биљних протеина осигуравају сигурну биолошку технику која се може користити за добивање производа са пожељним својствима (Zorn and Li 2017). Ензиматско умрежавање биополимера хране је атрактивна опција због специфичности ензима и благих реакцијских услова (Buchert et al. 2007; Isaschar-Ovdat and Fishman 2018). Тирозиназе су ензими зависни од бакра који катализирају орто-хидроксилацију монофенола до дифенола и накнадну оксидацију до орто-кинона. Коначно, реактивни кинони пролазе неензиматску полимеризацију у облику меланина (Fascio et al. 2012). За тирозиназу се наводи да повезује неколико протеина укључујући лизозим (Lantto et al. 2007), казеин, натријум казеин (Xu et al. 2016) и протеине сирутке (Thalmann and Lötzbauer 2002).

Тирозиназа из бактерије пронађена у земљишту, *Bacillus megaterium*, изолована је и окарактерисана (Shuster and Fishman 2009; Sendovski et al. 2010; 2011; Goldfeder et al. 2012; 2014).

Ензимски посредовано умрежавање, побољшава стабилност емулзије (углавном повећаном вискозношћу) различитих биљних протеина. Примјена умрежавања, такође, омогућава повезивање два комплементарна биљна протеина, да би се добио уравнотежени аминокиселински састав, што даље доприноси побољшавању функционалности протеина, као што су зеин или грашак. Умрежавање тирозиназом помогло је у формирању нових текстура, потенцијално водећи ка апликацији у разноврсним производима широког спектра, као што су немесни и немлијечни производи: као замјене за месо и сир, намазе, пјене и преливе за салату.

Концентроване емулзије уље у води су произведене мијешањем континуалне фазе (60%) са раствореним протеинима кромпира (6%) или протеинима грашка (2%) са диспергованом фазом (40%) представљеном уљем са или без додатка зеина (2%) (Glusac et al. 2017; 2018; 2019).

Тирозиназа је кориштена за модулацију својстава протеина кромпира који су кориштени као емулационо средство у стабилизацији концентрованих емулзија уље у води. Умрежавање је резултовало потпуном промјеном реолошких својстава и текстуре (Слика 14.3). Умрежена емулзија имала је самостојећу еластичну гел структуру. У односу на контролну емулзију, која није имала умрежавајући ензим, стабилност умрежене емулзије је била знатно продужена (Glusac et al. 2017).



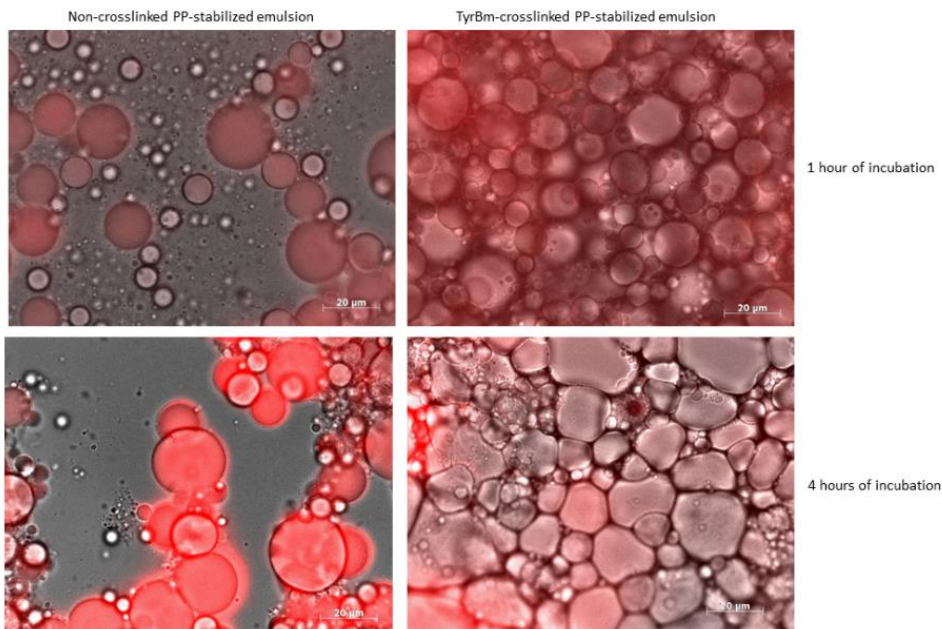
Слика 14.3. Фотографије и микрографије (20x увећање) неумрежених (А, В) и умрежених (С, D) емулзија стабилованих протеинима кромпира након 1 сат. Плаве траке представљају 40 μm (Glusac et al. 2017)

Figure 14.3. Photographs and micrographs (20x magnification) of potato protein non-crosslinked (A, B) and crosslinked emulsion (C, D) for 1 hour. Bars are 40 μm (Glusac et al. 2017)

Инвертном флуоресцентном микроскопијом уочено је формирање агрегата и густих мрежа састављених од капљица емулзије, што је допринијело да се емулзија понаша у облику гела (Слика 14.4). У случају неумрежене емулзије, примијећена је екстензивна флокулација и коалесценција, што је утицало на смањене стабилности емулзије (Glusac et al. 2017).

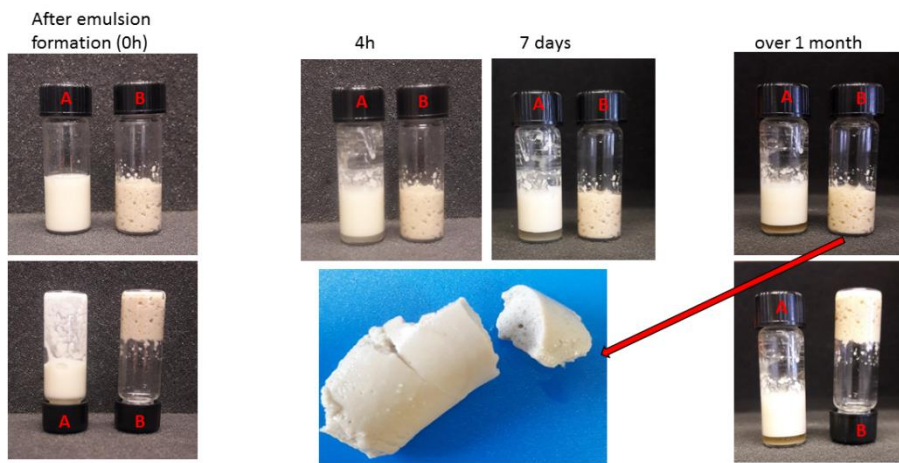
Зеин, као главни протеин кукуруза, због хидрофобне природе има слабу растворљивост у води и стога је ограничена његова примјена у прехранбеној индустрији. Зеин није алерген, али недостају му есенцијалне аминокиселине лизин и триптофан, те његова комбинација са другим комплементарним протеинима, као што су протеини кромпира, доводе до уравнотеженог прехранбеног производа (Glusac et al. 2018).

Када је зеин растворен у уљу, додан раствореним протеинима кромпира приликом формирања концентроване емулзије (уље у води) уз присуство ензима тирозиназе, добијена је стабилна емулзија (Glusac et al. 2018). Производ је имао конзистенцију аерисаног гела и био је стабилан током мјесец дана без примјетног одвајања фаза, у односу на неумрежену емулзију (Слика 14.5).



Слика 14.4. Инвертне микрографије уље у води умрежених и неумрежених емулзија стабилованих протеинима кромпира након 1 или 4 сата инкубације. Бијеле траке представљају 20 µm (Glusac et al. 2017)

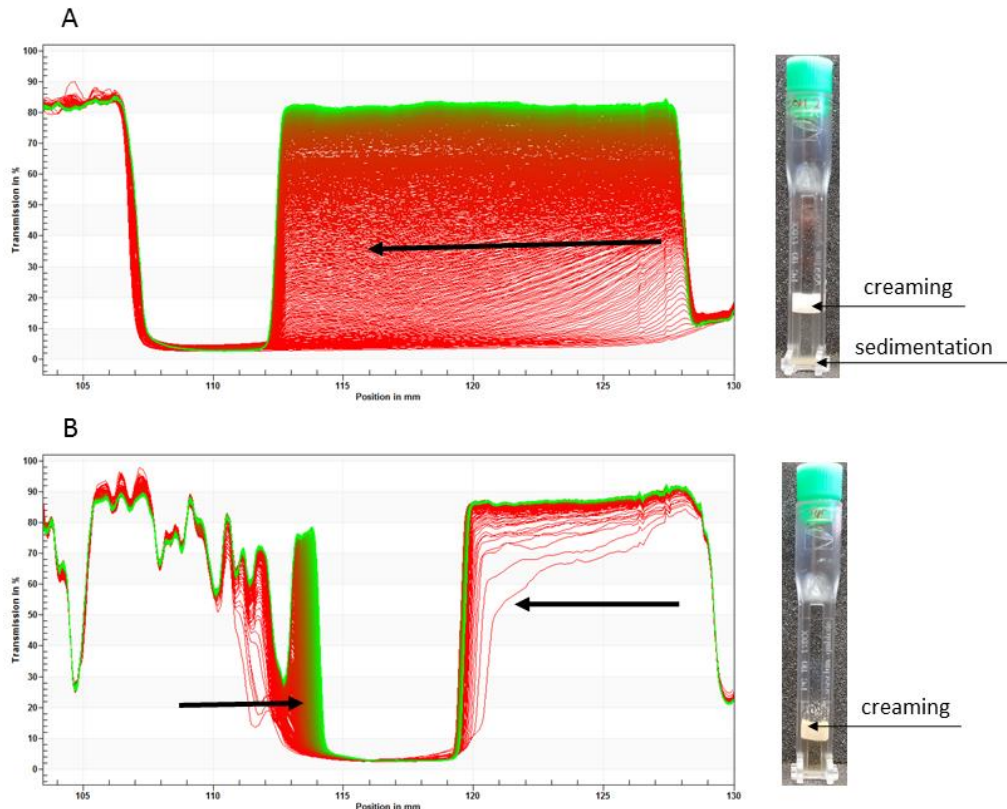
Figure 14.4. Inverted micrographs of 3-h o/w emulsions stabilized with PP that were crosslinked for 1 or 4 hours with tyrosinase or not-crosslinked. Bars are 20 µm (Glusac et al. 2017)



Слика 14.5. Визуелни приказ (А) неумрежене и (Б) тирозиназом умрежене зеин протеин кромпира стабиловане уље у води емулзије током 1 мјесеца складиштења на собној температури (Glusac et al. 2018)

Figure 14.5. Visible observation of (A) non-crosslinked and (B) tyrosinase-crosslinked zein-potato protein stabilized o/w emulsion over a period of 1 month of storage at room temperature (Glusac et al. 2018)

Присуство зеина у уљаној фази и протеина кромпира у воденој фази, уз присуство тирозиназе, су били умрежени и стварање нових ковалентних веза је утицало на елиминацију седиментације у умреженој гел-емулзији у односу на неумрежену емулзију, што је приказано у киветама након фотоцентрифуговања (Слика 14.6).

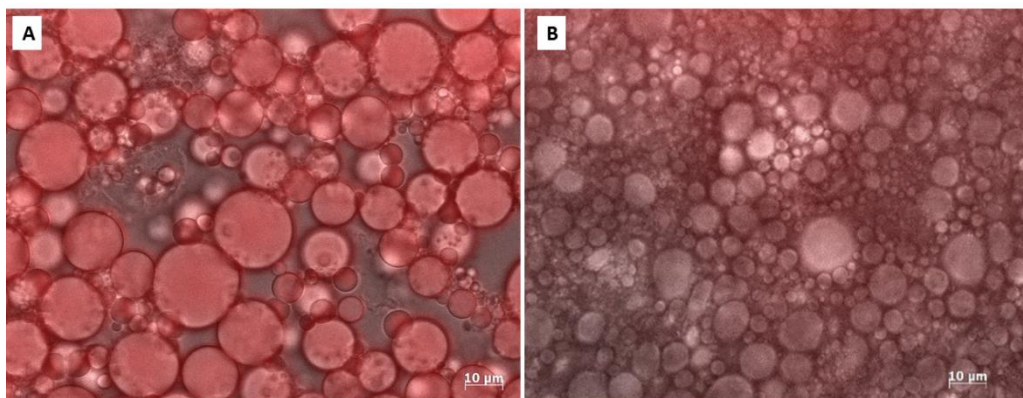


Слика 14.6. Фотоцентрифугални трансмисиони профили као функција дужине узорака кивета неумрежених (А) и тирозиназом умрежених зеин-протеини кромпира стабилизоване уље у води емулзија (Б). Боја профила трансмисије се мијењала из црвене у зелену како вријеме центрифугирања напредује од 0-20 сати. Стрелице означавају кретање профила трансмисије као функције времена (Glusac et al. 2018)

Figure 14.6. Photocentrifuge transmission profiles as a function of length of sample cuvettes of the non-crosslinked (A) and tyrosinase-crosslinked zein-potato protein stabilized o/w emulsion (B). The color of the transmission profiles changed from red to green as the time of centrifugation progressed from 0-20 h, respectively. Arrows indicate movement of the transmission profiles as a function of time (Glusac et al. 2018)

Микрографије инвертне флуоресцентне микроскопије показале су збијену и густу мрежу агрегата, састављених од капљица емулзије, код умрежене емулзије стабилизоване протеинима кромпира и зеином, док се неумрежена емулзија

одликовала карактеристикама нестабилности, што се види као коалесценција (Glusac et al. 2019) (Слика 14.7).

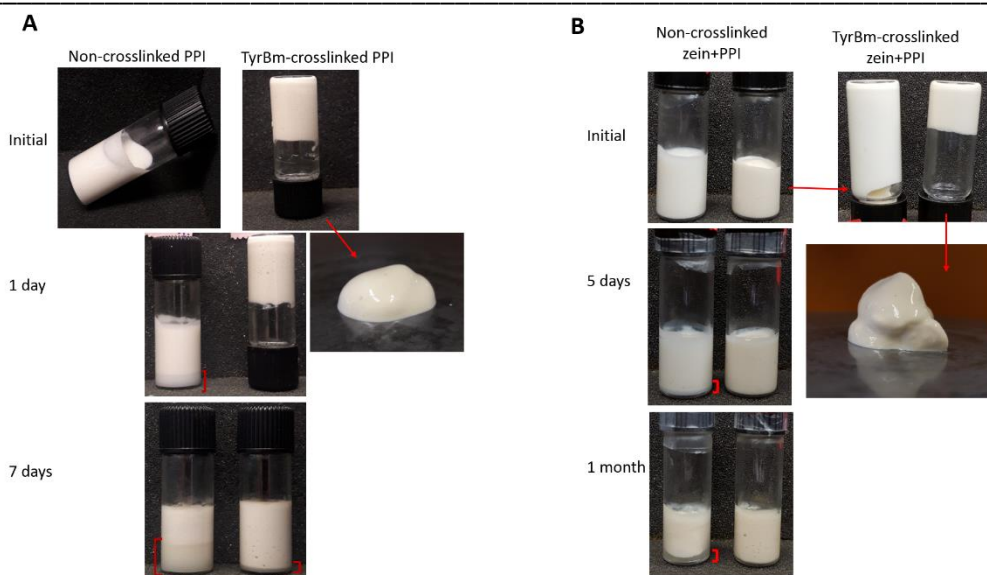


Слика 14.7. Инвертне микрографије (А) неумрежених и (Б) тирозиназом умрежених зеин-протеини кромпира стабилованих емулзија које су инкубирани током 4 сата. Микрографије су снимљене 3 сата након завршетка ензимског третмана. Бијеле траке представљају 10 µm (Glusac et al. 2018)

Figure 14.7. Inverted micrographs of (A) non-crosslinked and (B) tyrosinase-crosslinked zein-potato protein stabilized emulsions that were incubated for 4 hours. Micrographs were recorded 3 hours after the enzymatic treatment ended Bars are 10 µm (Glusac et al. 2018)

Када је кориштен протеин грашка умјесто протеина кромпира, док је зеин остао у уљаној фази, уз присуство тирозиназе, емулзија је имала конзистенцију креме, сугериришући да протеин растворљив у води има улогу у текстури производа (Glusac et al. 2019) (Слика 14.8). Инкорпорација зеина у уљану фазу утицала је и на продужену стабилност емулзије током складиштења. Умрежена емулзија стабилована са протеинима грашка и зеина је била стабилна више од мјесец дана, док је умрежена емулзија стабилована само са протеинима грашка била стабилна свега 7 дана (Слика 14.8).

Микрографије добијене инвертном флуоресцентном микроскопијом показале су да умрежена емулзија стабилована само са протеинима грашка има густу мрежу са збијеним паковањем капљица уља у поређењу са неумреженом емулзијом (Слика 14.9А, Б). Значајне промјене у микроструктури могу се примијетити послје инкорпорирања зеина у уљану фазу, што је видљиво као изузетно густа мрежа капљица уља (Слика 14.9Ц, Д).



Слика 14.8. (А) Визуелни приказ неумрежене и тирозиназом умрежене емулзије стабилизоване протеинима грашка и (Б) неумрежене и тирозиназом умрежене емулзије стабилизоване зеином и протеинима грашка током једног мјесеца складиштења на собној температури (Glusac et al. 2019)

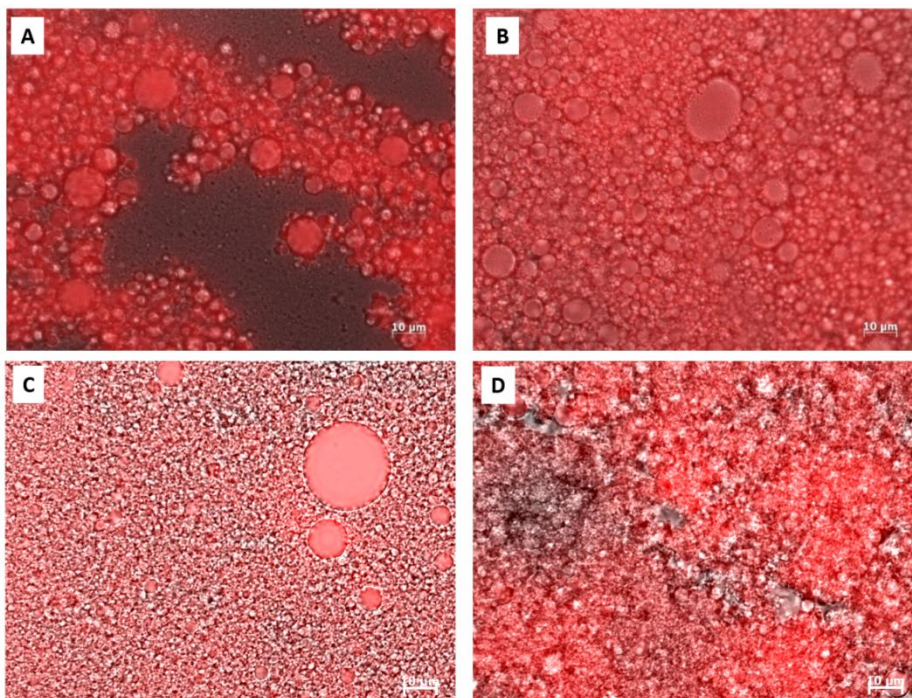
Figure 14.8. (A) Visible observation of non-crosslinked and tyrosinase-crosslinked pea protein stabilized o/w emulsions and (B) non-crosslinked and tyrosinase-crosslinked zein and pea protein stabilized o/w emulsion over one month of storage at the room temperature (Glusac et al. 2019)

14.5. Закључак

Један од изазова са којим се стручњаци у области прехранбене технологије суочавају је потреба производње прехранбених производа који потрошачу нуде пријемчиву текстуру и укупан сензорски ужитак, уз задовољавајућу нутритивну вриједност производа. Широм свијета у посљедњих неколико година, примјећен је тренд повећаних захтјева за вегетаријанским и веганским производима, што отвара нове могућности, као што су инкорпорација нових биљних протеина, као и протеина алги. У потрази за здравијим прехранбеним производима са смањеним садржајем масти и шећера, те оптималном текстуром и сензорским особинама, креирање нових прехранбених производа долази у први план истраживања.

Са порастом здравствене свијести и потребом да се смањи садржај шећера, масти и синтетичких састојака хране, праћено све већом потражњом за алтернативним протеинима које не зависе од извора животињског поријекла, истраживачи користе ензиматско умрежавање као сигурно и специфично биотехнолошко

средство за модулирање својстава матрикса хране уз одржавање жељене текстуре.



Слика 14.9. Инвертоване микрографије (А) неумрежених и тирозиназом-умрежених емулзија стабилованих протеинима грашка (Б) и неумрежених (Ц) и тирозиназом умрежених (Д) емулзија стабилованих комплексом зеин-протеини грашка након 2 сата инкубације. Бијеле траке представљају 10 µм. Микрографије су снимљене 2 сата након што је ензиматски третман завршен (Glusac et al. 2019)

Figure 14.9. Inverted micrographs of (A) pea protein stabilized non-crosslinked and tyrosinase-crosslinked o/w emulsion (B) and mixtures of zein and pea protein stabilized non-crosslinked (C) and tyrosinase-crosslinked o/w emulsion (D) after 2 hours of incubation. Bars are 10 µm. Micrographs were recorded 2 hours after the enzymatic treatment ended (Glusac et al, 2019)

Лаказе, тирозиназе, пероксидазе, те трансглутаминазе су корисна средства за умрежавање и генерисање нове текстуре, или за модулацију формулације производа уз одржавање жељене текстуре и сензорских својстава. Показано је да ензиматски третмани успјешно побољшавају својства протеинима стабиловане емулзије и гелова. Будућа комерцијализација оксидативних ензима омогућава повећану експлоатацију нових извора протеина за умрежавања, као и нове комбинације са већ познатим протеинима. Модулисање осјећаја ситости, дизајнирање замјена за месо, формулисање немлијечног сира и јогурта врхунске конзистенције, само су неке од могућности за примјену ензимски умрежених протеина у прехранбеној индустрији.

Литература

- Aiking H (2011) Future protein supply. *Trends in Food Science & Technology* 22(2–3): 112–120
- Alting AC, Pouvreau L, Giuseppin MLF and van Nieuwenhuijzen NH (2011) Potato proteins. In Williams GOPAPA (Ed.) *Handbook of Food Proteins*. Woodhead Publishing, Cambridge, pp 316-334
- Baier AK and Knorr D (2015) Influence of high isostatic pressure on structural and functional characteristics of potato protein. *Food Research International*, 77 (Part 4): 753-761
- Barac M, Cabrilo S, Pesic M, Stanojevic S, Zilic S, Macej O and Ristic N (2010) Profile and functional properties of seed proteins from six pea (*Pisum sativum*) genotypes. *International Journal of Molecular Sciences* 11(12): 4973–4990
- Bartova V and Barta J (2009) Chemical composition and nutritional value of protein concentrates isolated from potato (*Solanum tuberosum* L.) fruit juice by precipitation with ethanol or ferric chloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19): 9028-903.
- Blanco E, Smoukov SK, Velez OD and Velikov KP (2016) Organic-inorganic patchy particles as a versatile platform for fluid-in-fluid dispersion stabilisation. *Faraday Discussions* 191(0): 73-88
- Bohrer BM (2017) Review: Nutrient density and nutritional value of meat products and non-meat foods high in protein. *Trends in Food Science & Technology* 65: 103-112
- Boye J, Zare F and Pletch A (2010) Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International* 43(2): 414–431
- Buchert J, Selinheimo E, Kruus K, Mattinen M-L, Lantto R and Autio K (2007) Using crosslinking enzymes to improve textural and other properties of food. In: Rastall R (Ed.) *Novel Enzyme Technology for Food Applications*. Woodhead Publishing, Cambridge, pp 101-139
- Calero N, Muñoz, J, Cox PW, Heuer A and Guerrero A (2013) Influence of chitosan concentration on the stability, microstructure and rheological properties of O/W emulsions formulated with high-oleic sunflower oil and potato protein. *Food Hydrocolloids* 30(1): 152-162
- Chen XW, Fu S-Y, Hou J-J, Guo J, Wang J-M and Yang X-Q (2016) Zein based oil-in-glycerol emulgels enriched with β -carotene as margarine alternatives. *Food Chemistry* 211: 836-844
- Cheng Y, Xiong YL and Chen J (2010) Antioxidant and emulsifying properties of potato protein hydrolysate in soybean oil-in-water emulsions. *Food Chemistry* 120(1): 101-108
- Creusot N, Wierenga PA, Laus MC, Giuseppin MLF and Gruppen H (2011) Rheological properties of patatin gels compared with beta-lactoglobulin, ovalbumin, and glycinin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(2): 253-261

- David S and Livney YD (2016) Potato protein based nanovehicles for health promoting hydrophobic bioactives in clear beverages. *Food Hydrocolloids* 57: 229-235
- Delahaije R.J, Wierenga PA, Giuseppin ML and Gruppen H (2014) Improved emulsion stability by succinylation of patatin is caused by partial unfolding rather than charge effects. *Journal of Colloid and Interface Science* 430: 69-77
- Delahaije RJ, Gruppen H van Nieuwenhuijzen NH, Giuseppin ML and Wierenga PA (2013) Effect of glycation on the flocculation behavior of protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Langmuir*, 29(49): 15201-15208
- Dhillon GS, Kaur S, Oberoi HS, Spier MR and Brar SK (2016) Agricultural-based protein by-products: Characterization and applications. In: Dhillon GS (Ed.) *Protein Byproducts*, 1st ed., Academic Press, pp. 21-36
- Faccio G, Kruus K, Saloheimo M and Thöny-Meyer L (2012) Bacterial tyrosinases and their applications. *Process Biochemistry* 47(12): 1749-1760
- Fairhead M and Thöny-Meyer L (2010) Cross-linking and immobilisation of different proteins with recombinant *Verrucomicrobium spinosum* tyrosinase. *Journal of Biotechnology* 150(4): 546-551
- Fairhead M and Thony-Meyer L (2012) Bacterial tyrosinases: old enzymes with new relevance to biotechnology. *New Biotechnology* 29(2): 183-191
- FAO (2011) Dietary protein quality evaluation in human nutrition. FAO food and nutrition paper 92
- Friedman M (1996) Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(1): 6-29
- Gambuti A, Rinaldi A and Moio L (2012) Use of patatin, a protein extracted from potato, as alternative to animal proteins in fining of red wine. *European Food Research and Technology* 235(4): 753-765
- Gambuti A, Rinaldi A, Romano R, Manzo N and Moio L (2016) Performance of a protein extracted from potatoes for fining of white musts. *Food Chemistry* 190: 237-243
- Glusac J, Davidesko-Vardi I, Isaschar-Ovdat S, Kukavica B and Fishman A (2019) Tyrosinase-crosslinked pea protein emulsions: Impact of zein incorporation. *Food Research International* 116: 370–378
- Glusac J, Davidesko-Vardi I, Isaschar-Ovdat S, Kukavica B and Fishman A (2018) Gel-like emulsions stabilized by tyrosinase-crosslinked potato and zein proteins. *Food Hydrocolloids* 82: 53–63
- Glusac J, Isaschar-Ovdat S, Kukavica B and Fishman A (2017) Oil-in-water emulsions stabilized by tyrosinase-crosslinked potato protein. *Food Research International* 100: 407-415
- Grujić R, Vučić G, Grujić S, Vukić M. i Odžaković B (2014) Uticaj biljnih vlakana na teksturu i senzorna svojstva funkcionalnih barenih kobasica. *Savremene tehnologije* 3 (1): 5-10
- Goldfeder M, Kanteev M, Isaschar-Ovdat S, Adir N and Fishman A (2014) Determination of tyrosinase substrate-binding modes reveals mechanistic differences between type-3 copper proteins. *Nature Communications* e-pub 5: 4505 (doi: 10.1038/ncomms5505)

- Goldfeder M, Egozy M, Shuster Ben-Yosef V, Adir N and Fishman A (2012) Changes in tyrosinase specificity by ionic liquids and sodium dodecyl sulfate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(5): 1953-1961
- Gu J, Xin Z, Meng X, Sun S, Qiao Q and Deng H (2016) A “reduced-pressure distillation” method to prepare zein-based fat analogue for application in mayonnaise formulation. *Journal of Food Engineering* 182: 1-8
- Heck T, Faccio G, Richter M and Thöny-Meyer L (2013) Enzyme-catalyzed protein crosslinking. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(2): 461-475
- Heijns WH, Wierenga PA, van Berkel WJH and Gruppen H (2010) Directing the oligomer size distribution of peroxidase-mediated cross-linked bovine alpha-lactalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(9): 5692-5697
- Hicks TM and Verbeek CJR (2016) Protein-rich by-products: Production statistics, legislative restrictions, and management options In Dhillon GS (Ed.) *Protein Byproducts*, 1st ed. Academic Press, pp. 1-18
- Huang S, Adams WR, Zhou Q, Malloy KP, Voyles DA, Anthony J, Kriz AL and Luethy MH (2004) Improving nutritional quality of maize proteins by expressing sense and antisense zein genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(7): 1958-1964
- Isaschar-Ovdat S and Fishman A (2018) Crosslinking of food proteins mediated by oxidative enzymes – A review. *Trends in Food Science & Technology* 72: 134-143
- Jeong S, Kim HW and Lee S (2017) Rheological and secondary structural characterization of rice flour-zein composites for noodles slit from gluten-free sheeted dough. *Food Chemistry* 221: 1539-1545
- Juvonen KR, Karhunen LJ, Vuori E, Lille ME, Karhu T, Jurado-Acosta A, Laaksonen DE, Mykkänen HM, Niskanen LK and Poutanen KS (2011) Structure modification of a milk protein-based model food affects postprandial intestinal peptide release and fullness in healthy young men. *British Journal of Nutrition* 106(12): 1890-1898
- Kennedy AR (1998) Chemopreventive agents: protease inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics* 78(3): 167-209
- Knorr D, Kohler GO and Betschart AA (1977) Potato protein concentrates: The influence of various methods of recovery upon yield, compositional and functional characteristics. *Journal of Food Processing and Preservation* 1(3): 235-247
- Komarnutsky S, Cook A and Raskin I (2011) Potato protease inhibitors inhibit food intake and increase circulating cholecystokinin levels by a trypsin-dependent mechanism. *International Journal of Obesity* 35(2): 236-243
- Lantto R, Puolanne E, Kruus K, Buchert J and Autio K (2007) Tyrosinase-aided protein cross-linking: effects on gel formation of chicken breast myofibrils and texture and water-holding of chicken breast meat homogenate gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(4): 1248-1255
- Lawton JW (2002) Zein: A history of processing and use. *Cereal Chemistry Journal* 79(1): 1-18
- Liedl BE, Kosier T and Desborough SL (1987) HPLC isolation and nutritional value of a major tuber protein. *American Potato Journal* 64(10): 545-557

- Liyanage R, Han K-H, Watanabe S, Shimada KI, Sekikawa M, Ohba K, Tokuji Y, Ohnishi M, Shibayama S, Nakamori T and Fukushima M (2008) Potato and soy peptide diets modulate lipid metabolism in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72(4): 943-950
- Løkra S, Schüller RB, Egelanddal B, Engebretsen B and Strætkvern KO (2009) Comparison of composition, enzyme activity and selected functional properties of potato proteins isolated from potato juice with two different expanded bed resins. *LWT - Food Science and Technology* 42(4): 906-913
- Løkra S, Helland MH, Claussen IC, Strætkvern KO and Egelanddal B (2008) Chemical characterization and functional properties of a potato protein concentrate prepared by large-scale expanded bed adsorption chromatography. *LWT - Food Science and Technology* 41(6): 1089-1099
- Luo Y and Wang T (2016) Pharmaceutical and cosmetic applications of protein by-products. In: Dhillon GS (Ed.) *Protein Byproducts*, 1st ed. Academic Press, pp. 147-160
- Miedzianka J and Pełksa A (2013) Effect of pH on phosphorylation of potato protein isolate. *Food Chemistry* 138(4): 2321-2326
- Ni N and Dumont M-J (2017) Protein-based hydrogels derived from industrial byproducts containing collagen, keratin, zein and soy. *Waste and Biomass Valorization* 8(2): 285-300
- Nieto G, Castillo M, Xiong YL, Alvarez D, Payne FA and Garrido MD (2009) Antioxidant and emulsifying properties of alcalase-hydrolyzed potato proteins in meat emulsions with different fat concentrations. *Meat Science* 83(1): 24-30
- Paraman I and Lamsal BP (2011) Recovery and characterization of α -zein from corn fermentation coproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(7): 3071-3077
- Partanen R, Torkkeli M, Hellman M, Permi P, Serimaa R, Buchert J and Mattinen M-L (2011) Loosening of globular structure under alkaline pH affects accessibility of β -lactoglobulin to tyrosinase-induced oxidation and subsequent cross-linking. *Enzyme and Microbial Technology* 49(2): 131-138
- Patel AR and Velikov KP (2014) Zein as a source of functional colloidal nano- and microstructures. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 19(5): 450-458
- Patel AR, Heussen PCM, Hazekamp J, Drost E and Velikov KP (2012) Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium. *Food Chemistry* 133(2): 423-429
- Patel AR, Bouwens ECM and Velikov KP (2010) Sodium caseinate stabilized zein colloidal particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(23): 12497-12503
- Pots AM, Gruppen H, van Diepenbeek R, van der Lee JJ, van Boekel MAJS, Wijngaards G and Voragen AGJ (1999) The effect of storage of whole potatoes of three cultivars on the patatin and protease inhibitor content; a study using capillary electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79(12): 1557-1564

- Pouvreau L, Gruppen H, van Koningsveld G, van den Broek LA and Voragen AG (2005) Conformational stability of the potato serine protease inhibitor group. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(8): 3191-3196
- Pouvreau L, Gruppen H, Piersma SR, van den Broek LAM, van Koningsveld GA and Voragen AGJ (2001) Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(6): 2864-2874
- Ralet M-C and Guéguen J (2000) Fractionation of potato proteins: solubility, thermal coagulation and emulsifying properties. *LWT - Food Science and Technology* 33(5): 380-387
- Romero A, Beaumal V, David-Briand E, Cordobes F, Guerrero A and Anton M (2011) Interfacial and oil/water emulsions characterization of potato protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(17): 9466-9474
- Santos J, Calero N, Guerrero A and Muñoz J (2015) Relationship of rheological and microstructural properties with physical stability of potato protein-based emulsions stabilized by guar gum. *Food Hydrocolloids* 44: 109-114.
- Selinheimo E, NiEidhin D, Steffensen C, Nielsen J, Lomascolo A, Halaouli S, Record E, O'Beirne D, Buchert J and Kruus K (2007) Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. *Journal of Biotechnology* 130(4): 471-480
- Sendovski M, Kanteev M, Ben-Yosef VS, Adir N and Fishman A (2011) First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *Journal of Molecular Biology* 405(1): 227-237
- Sendovski M, Kanteev M, Shuster Ben-Yosef V, Adir N and Fishman A (2010) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a bacterial tyrosinase from *Bacillus megaterium*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(Pt 9): 1101-1103
- Seo S, Karboune S and Archelas (2014). Production and characterisation of potato patatin-galactose, galactooligosaccharides, and galactan conjugates of great potential as functional ingredients. *Food Chemistry* 158: 480-489
- Shukla R and Cheryan M (2001) Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products* 13(3): 171-192
- Shuster V and Fishman A (2009) Isolation, cloning and characterization of a tyrosinase with improved activity in organic solvents from *Bacillus megaterium*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 17(4): 188-200
- Smith BM, Bean SR, Selling G, Sessa D and Aramouni FM (2017) Effect of salt and ethanol addition on zein–starch dough and bread quality. *Journal of Food Science* 82(3): 613-621
- Spelbrink REJ, Lensing H, Egmond MR and Giuseppin MLF (2015) Potato patatin generates short-chain fatty acids from milk fat that contribute to flavour development in cheese ripening. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 176(1): 231-243
- Sun Y, Jiang L and Wei D (2013) Partial characterization, in vitro antioxidant and antiproliferative activities of patatin purified from potato fruit juice. *Food & Function* 4(10): 1502-1511

- Sun XD and Arntfield SD (2011) Gelation properties of salt-extracted pea protein isolate catalyzed by microbial transglutaminase cross-linking. *Food Hydrocolloids* 25(1): 25–31
- Thalmann C and Lötzbeyer T (2002) Enzymatic cross-linking of proteins with tyrosinase. *European Food Research and Technology* 214(4): 276-281
- Udenigwe CC, Udechukwu MC, Yiridoe C, Gibson A and Gong M (2016) Antioxidant mechanism of potato protein hydrolysates against in vitro oxidation of reduced glutathione. *Journal of Functional Foods* 20: 195-203
- van Koningsveld GA, Walstra P, Voragen AGJ, Kuijpers IJ, Van Boekel MAJS and Gruppen H (2006) Effects of protein composition and enzymatic activity on formation and properties of potato protein stabilized emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(17): 6419-6427
- van Koningsveld GA, Walstra P, Gruppen H, Wijngaards G, van Boekel MAJS and Voragen AGJ (2002) Formation and stability of foam made with various potato protein preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(26): 7651-7659
- van Koningsveld GA, Gruppen H, de Jongh HHJ, Wijngaards G, van Boekel MAJS, Walstra P and Voragen AGJ (2001) Effects of pH and heat treatments on the structure and solubility of potato proteins in different preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(10): 4889-4897
- Vate NK and Benjakul S (2016) Effect of the mixtures of squid ink tyrosinase and tannic acid on properties of sardine surimi gel. *Journal of Food Science and Technology* 53(1): 411-420
- Vikelouda M and Kiosseoglou V (2004) The use of carboxymethylcellulose to recover potato proteins and control their functional properties. *Food Hydrocolloids* 18(1): 21-27
- Witczak T, Juszczak L, Ziobro R and Korus J (2017) Rheology of gluten-free dough and physical characteristics of bread with potato protein. *Journal of Food Process Engineering* 40(3): e12491-n/a
- Xu R, Teng Z and Wang Q (2016) Development of tyrosinase-aided crosslinking procedure for stabilizing protein nanoparticles. *Food Hydrocolloids* 60: 324-334
- Zorn H and Li Q X (2017) Trends in Food Enzymology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(1): 4-5

The use of plant proteins in the production of food for humans

Jovana Glušac, Biljana Kukavica, Aulet Fišman

The increasing preference of vegetarian and vegan diets has led to the development of new and diverse food formulations based on plant proteins with high nutritive value. Industrial side-products such as functional potato proteins and non-functional corn zein fractions, along with pea proteins are promising sources of protein in food applications. The main goal of recent researches was to improve the functionality of zein, a by-

product of the starch industry, and usage of potato protein along with pea protein by enzyme-mediated covalent crosslinking, and to enable its usage in food applications. It has been demonstrated for the first time the functionalization of zein in concentrated oil-in-water emulsions. Emulsions comprising 40% oil were fabricated using enzymatic crosslinking of potato protein or pea protein solubilized in the aqueous phase and zein solubilized in the oil phase. It has been shown that bacterial tyrosinase isolated and purified from *Bacillus megaterium* plays a crucial role in the gel-like structure formation of zein-potato protein or zein-pea protein stabilized emulsions. The tyrosinase-crosslinked emulsions were stable over a month without noticeable separation, compared to the non-crosslinked emulsions. The increase in stability is attributed to the formation of covalent bonds between potato and/or pea proteins and zein protein fractions. Additionally, the presence of tyrosinase led to better stability, increased viscosity and paste like structure compared to zein-pea protein emulsion without tyrosinase. Zein and potato protein or pea protein complement each other in their amino acid composition and thus provide complete nutritional value to consumers. Enzymatic covalent bond formation in zein-pea protein or zein-potato protein complexes could be an important approach to design and tailor different vegan or vegetarian emulsion-based foods.

Key words: Vegetable proteins, Potato proteins, Proteins and peas, Zein proteins

